

UNTERSUCHUNGEN ÜBER EINE
CAROTINASEAKTIVITÄT
IN OVARIELLEN RINDERFOLLIKELN

MARKUS WIERICH

1988

Disbui. München





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER EINE CAROTINASEAKTIVITÄT
IN OVARIELLEN RINDERFOLLIKELN**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
MARKUS WIERICH
aus
Elsenfeld

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Prof. Dr. H. Zucker
Korreferent: Prof. Dr. W. Rössner

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

1	EINLEITUNG DES VERFAHRENS	1
2	LITERATURVERZEICHNIS	2
3.1	Einleitung und Zusammenfassung	3
3.1.1	Einleitung	3
3.1.2	Zusammenfassung	4
3.1.3	Zusammenfassung	4
3.1.3.1	Zusammenfassung	4
3.1.3.2	Zusammenfassung	4
3.1.3.3	Zusammenfassung	4
3.1.3.4	Zusammenfassung	4
3.1.3.5	Zusammenfassung	4
3.1.3.6	Zusammenfassung	4
3.1.3.7	Zusammenfassung	4
3.1.3.8	Zusammenfassung	4
3.1.3.9	Zusammenfassung	4
3.1.3.10	Zusammenfassung	4
3.1.3.11	Zusammenfassung	4
3.1.3.12	Zusammenfassung	4
3.1.3.13	Zusammenfassung	4
3.1.3.14	Zusammenfassung	4
3.1.3.15	Zusammenfassung	4
3.1.3.16	Zusammenfassung	4
3.1.3.17	Zusammenfassung	4
3.1.3.18	Zusammenfassung	4
3.1.3.19	Zusammenfassung	4
3.1.3.20	Zusammenfassung	4
3.1.3.21	Zusammenfassung	4
3.1.3.22	Zusammenfassung	4
3.1.3.23	Zusammenfassung	4
3.1.3.24	Zusammenfassung	4
3.1.3.25	Zusammenfassung	4
3.1.3.26	Zusammenfassung	4
3.1.3.27	Zusammenfassung	4
3.1.3.28	Zusammenfassung	4
3.1.3.29	Zusammenfassung	4
3.1.3.30	Zusammenfassung	4
3.1.3.31	Zusammenfassung	4
3.1.3.32	Zusammenfassung	4
3.1.3.33	Zusammenfassung	4
3.1.3.34	Zusammenfassung	4
3.1.3.35	Zusammenfassung	4
3.1.3.36	Zusammenfassung	4
3.1.3.37	Zusammenfassung	4
3.1.3.38	Zusammenfassung	4
3.1.3.39	Zusammenfassung	4
3.1.3.40	Zusammenfassung	4
3.1.3.41	Zusammenfassung	4
3.1.3.42	Zusammenfassung	4
3.1.3.43	Zusammenfassung	4
3.1.3.44	Zusammenfassung	4
3.1.3.45	Zusammenfassung	4
3.1.3.46	Zusammenfassung	4
3.1.3.47	Zusammenfassung	4
3.1.3.48	Zusammenfassung	4
3.1.3.49	Zusammenfassung	4
3.1.3.50	Zusammenfassung	4
3.1.3.51	Zusammenfassung	4
3.1.3.52	Zusammenfassung	4
3.1.3.53	Zusammenfassung	4
3.1.3.54	Zusammenfassung	4
3.1.3.55	Zusammenfassung	4
3.1.3.56	Zusammenfassung	4
3.1.3.57	Zusammenfassung	4
3.1.3.58	Zusammenfassung	4
3.1.3.59	Zusammenfassung	4
3.1.3.60	Zusammenfassung	4
3.1.3.61	Zusammenfassung	4
3.1.3.62	Zusammenfassung	4
3.1.3.63	Zusammenfassung	4
3.1.3.64	Zusammenfassung	4
3.1.3.65	Zusammenfassung	4
3.1.3.66	Zusammenfassung	4
3.1.3.67	Zusammenfassung	4
3.1.3.68	Zusammenfassung	4
3.1.3.69	Zusammenfassung	4
3.1.3.70	Zusammenfassung	4
3.1.3.71	Zusammenfassung	4
3.1.3.72	Zusammenfassung	4
3.1.3.73	Zusammenfassung	4
3.1.3.74	Zusammenfassung	4
3.1.3.75	Zusammenfassung	4
3.1.3.76	Zusammenfassung	4
3.1.3.77	Zusammenfassung	4
3.1.3.78	Zusammenfassung	4
3.1.3.79	Zusammenfassung	4
3.1.3.80	Zusammenfassung	4
3.1.3.81	Zusammenfassung	4
3.1.3.82	Zusammenfassung	4
3.1.3.83	Zusammenfassung	4
3.1.3.84	Zusammenfassung	4
3.1.3.85	Zusammenfassung	4
3.1.3.86	Zusammenfassung	4
3.1.3.87	Zusammenfassung	4
3.1.3.88	Zusammenfassung	4
3.1.3.89	Zusammenfassung	4
3.1.3.90	Zusammenfassung	4
3.1.3.91	Zusammenfassung	4
3.1.3.92	Zusammenfassung	4
3.1.3.93	Zusammenfassung	4
3.1.3.94	Zusammenfassung	4
3.1.3.95	Zusammenfassung	4
3.1.3.96	Zusammenfassung	4
3.1.3.97	Zusammenfassung	4
3.1.3.98	Zusammenfassung	4
3.1.3.99	Zusammenfassung	4
3.1.3.100	Zusammenfassung	4

Meinen Eltern
in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 β -Carotin und Carotinoide	3
2.1.1 Vorkommen, Bedeutung	3
2.1.2 β -Carotin und Fruchtbarkeit	4
2.1.2.1 Rind	4
2.1.2.2 Andere Tierarten	8
2.1.3 β -Carotin und Krebs	8
2.2 Carotinase (β -Carotin-15,15'-dioxygenase)	11
2.2.1 Untersuchungen in vivo	11
2.2.2 Untersuchungen in vitro	12
2.2.3 Mechanismus	13
2.2.3.1 "Zentrale Spaltung"	13
2.2.3.2 "Terminale Spaltung"	15
2.2.3.3 "Zufällige Spaltung"	17
2.3 Vitamin A	19
2.3.1 Stoffwechsel	19
2.3.2 Funktionen	21
2.3.3 Wirkungsweise	21
2.4 Der Follikel	22
2.4.1 Reifung und Differenzierung	22
2.4.2 Reifung der Oocyte	26
2.4.3 Follikelflüssigkeit	28
2.4.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften	28
2.4.3.2 Elektrolyte	28
2.4.3.3 Proteine	29
2.4.3.4 Hormone	29
2.4.3.5 Vitamine	31

3	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1	Chemikalien	33
3.2	Probengewinnung	33
3.3	Enzympräparation	35
3.4	Bestimmung der Enzymaktivität	36
3.4.1	Lösungen	36
3.4.2	Enzymatische Umsetzung	37
3.4.3	Extraktionsverfahren	38
3.4.4	HPLC-Analysen	38
3.4.5	Radioaktivitätsbestimmungen	39
3.4.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
3.4.7	Berechnung der Enzymaktivität	40
3.5	Bestimmung verschiedener Vitamin-A-Formen in Follikelflüssigkeit und Serum	40
3.6	Bestimmung von Retinol, Retinylestern und Tocopherol in der Follikelflüssigkeit	42
3.7	Hormonanalysen	42
3.8	Cholesterinbestimmung	43
3.9	Statistische Methoden	43
4	ERGEBNISSE	44
4.1	Methodik	44
4.1.1	Enzympräparation	44
4.1.2	Inkubationsbedingungen	44
4.1.3	Extraktionsverfahren	45
4.1.4	HPLC-Analysen	46
4.2	Untersuchungen zur Carotinaseaktivität	49
4.3	Konzentrationen von 17 β -Östradiol, Progesteron, Retinol, β -Carotin, Vitamin E und Cholesterin in der Follikelflüssigkeit	50
4.4	Vitamin-A-Formen in Follikelflüssigkeit und Serum	53
4.5	Beziehungen von Carotinaseaktivität, Follikelgröße und verschiedener intra- follikulärer Parameter zueinander	53

5	DISKUSSION	56
5.1	Methodik	56
5.1.1	Enzympräparation	56
5.1.2	Inkubationsbedingungen	57
5.1.3	Analyse von Retinsäure, Retinol und Retinal	58
5.2	Vitamin-A-Stoffwechsel des ovariellen Rinder- follikels	59
5.3	Schlußfolgerung	67
6	ZUSAMMENFASSUNG	69
	SUMMARY	70
7	LITERATURVERZEICHNIS	71

Die Bedeutung der mit der Nahrung aufgenommenen Carotinoide als Vitamin-A-Vorstufe im Darm ist seit langem bekannt. Vermutungen über eine zusätzliche, möglicherweise lokale Wirkung in peripheren Geweben sind in den letzten Jahren vermehrt angestellt worden. So fanden Untersucher aus der Humanmedizin, daß sich bestimmte Tumorarten durch β -Carotin beeinflussen lassen (PETO et al., 1981). Eine eigenständige, Vitamin-A-unabhängige Wirkung des β -Carotins im Fruchtbarkeitsgeschehen des Rindes wurde erstmals von BRÜGGEMANN und NIESAR (1956) postuliert. Bestätigende Ergebnisse lieferte die Arbeitsgruppe um LOTTHAMMER (1978). Im Gegensatz dazu konnten FOLMAN et al. (1979) keine derartige Wirkung nachweisen. Dieser Widerspruch läßt sich nur teilweise durch die unterschiedliche Versuchsanordnung erklären. Klarheit darüber, ob das β -Carotin beim Rind tatsächlich eine spezifische, Vitamin-A-unabhängige Wirkung auf das Fruchtbarkeitsgeschehen hat, könnte man sich von der Aufklärung der Abläufe auf zellulärer Ebene erwarten.

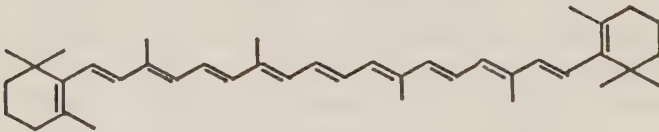
Untersuchungen von SCHWEIGERT & ZUCKER (1988) zeigen, daß zwischen der Qualität der Follikel und der Vitamin-A-Konzentration in der Follikelflüssigkeit eine sehr deutliche Abhängigkeit besteht, während dies für β -Carotin, Vitamin E und Cholesterin nicht gilt. Als Ursache hierfür wird von den Autoren eine lokale Umwandlung von β -Carotin zu Vitamin A in den Granulosazellen der reifenden, dominanten Follikel vermutet. Dem hierdurch regulierten Vitamin-A-Gehalt der Follikelflüssigkeit könnte nach diesen Überlegungen eine besondere Rolle bei der Selektion und Reifung des später zur Ovulation gelangenden Follikels zukommen. Die spezifisch eigenständigen Wirkung von



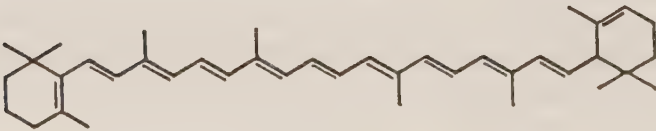
β -Carotin auf die Fruchtbarkeit des Rindes ließe sich deshalb mit einer essentiellen, lokalen Provitamin-A-Funktion erklären.

Der Nachweis des für diese Umwandlung notwendigen Enzyms, einer Carotinase, wurde bisher in follikulären Strukturen nicht geführt. Er ist ein Schritt zum besseren Verständnis der Funktion von β -Carotin im Fruchtbarkeitsgeschehen des Rindes und war deshalb Ziel dieser Arbeit.

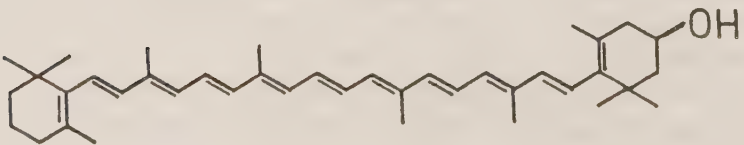
Abbildung 1: Einige wichtige Carotinoide



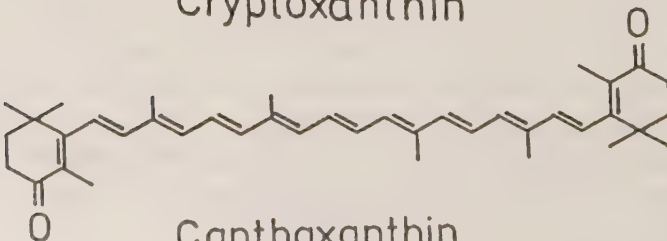
β - Carotin



α - Carotin



Cryptoxanthin



Canthaxanthin

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 β -Carotin und Carotinoide

2.1.1 Vorkommen, Bedeutung

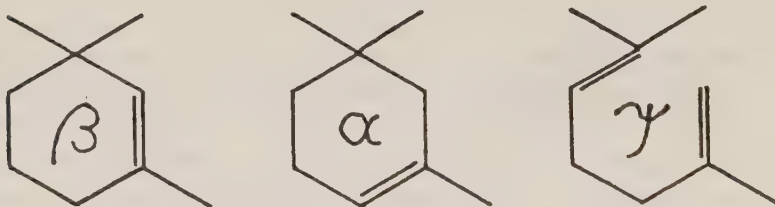
Die Carotinoide gehören zu den in der Natur am weitesten verbreiteten Pigmenten. Ihre Fähigkeit, Strahlungsenergie aus dem kurzwelligeren Bereich des sichtbaren Spektrums aufzunehmen und auf die eigentlichen Photosynthesepigmente zu übertragen, macht sie für alle grünen Pflanzen unentbehrlich. Außerdem schützen sie die Zellen vor den beim Photosyntheseprozess entstehenden Sauerstoffradikalen (KORNHAUSER et al., 1986). Während Pflanzen sowie zahlreiche Pilze und Bakterien Carotinoide de novo synthetisieren können, fehlt diese Fähigkeit allen Tieren. Sie können Carotinoide nur in charakteristischer Weise verändern.

Chemisch handelt es sich bei den Carotinoiden um konjugierte Polyenkohlenwasserstoffe, die endständig je einen offenen oder geschlossenen Sechsering tragen und aus acht Isopren-Einheiten (40 Kohlenstoff-Atome) aufgebaut sind. Man unterscheidet zwischen den rot bis orange gefärbten Carotinen, die nur aus Kohlenstoff und Wasserstoff bestehen, und den gelben bis braunen Xanthophyllen, die zusätzlich noch Sauerstoff enthalten (KRINSKI & DENEKE, 1982). (Abb. 1)

Wie sich aus dem Vergleich der Strukturformeln mit der von Vitamin A leicht ableiten läßt, kommen nur solche Carotinoide, die mindestens einen unsubstituierten β -Iononring tragen, als Provitamine A in Frage (Abb. 2). β -Carotin besitzt zwei β -Iononringe und weist in biologischen Tests

eine etwa doppelt so hohe Provitamin-A-Wirksamkeit auf wie andere Carotinoide (TIEWS, 1963).

Abbildung 2: α -, β -, und γ -Iononring



2.1.2 β -Carotin und Fruchtbarkeit

2.1.2.1 Rind

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, daß sich die Bedeutung von β -Carotin auf seine Funktion als Provitamin A beschränkt. Eine Vitamin-A-unabhängige, eigenständige physiologische Wirkung auf das Fruchtbarkeitsgeschehen des Rindes wurde erstmals von BRÜGGEMANN und NIESAR (1956) vermutet. Erste klinische Hinweise dafür fand SEITARIDIS (1963). Er stellte fest, daß der β -Carotingehalt im Blutplasma von Kühen mit Ovarialzysten signifikant niedriger lag als bei Tieren mit ungestörter Eierstockfunktion. KONERMANN (1967) konnte anhand von Felduntersuchungen eine steigende Carotinversorgung mit einer Verkürzung der Zwischenkalbezeit sowie einer Abnahme der Besamungsindices korrelieren.

Mehrjährige experimentelle Untersuchungen führte die Arbeitsgruppe um LOTTHAMMER (1978) zu dieser Fragestellung mit Färsen und Kühen durch. Dabei wurden bei den

β -Carotin-Mangelgruppen trotz kompensierender Vitamin-A-Versorgung folgende Störungen festgestellt:

- 1) Stille Brunst oder schwächer ausgeprägte äußere Brunstsymptome bei verlängerter Brunstdauer (LOTTHAMMER et al., 1976).
- 2) Verzögerte Ovulation, gemessen am Zeitintervall zwischen LH-Gipfel und Ovulation (SCHAMS et al., 1977).
- 3) Vermehrtes Auftreten von Follikel- und Gelbkörperzysten (MEYER et al., 1975).
- 4) Langsamere und geringere An- und Ausbildung der Gelbkörper (LOTTHAMMER, 1978).
- 5) Gehäuftes Auftreten von embryonalem Fruchttod in der 5.-7. Trächtigkeitswoche sowie von Frühaborten im 4.-5. Trächtigkeitsmonat (LOTTHAMMER, 1978).
- 6) Verschlechterte Befruchtungsergebnisse mit erhöhter Zahl an Nachbesamungen (LOTTHAMMER et al., 1976).
- 7) Verzögerte Rückbildung der Gebärmutter und späterer Beginn der erneuten Eierstocksfunktion nach der Geburt (LOTTHAMMER, 1978).

Zahlreiche Autoren konnten im Folgenden diese Ergebnisse - zumindest in Teilaspekten - bestätigen und ergänzen. So wiesen ZUCKER et al. (1980) ebenfalls vermehrt Follikelzysten und verzögerte Ovulationen bei β -Carotinmangel nach, ohne jedoch Unterschiede hinsichtlich Brunstdauer und Besamungserfolg zu beobachten. ARBEITER et al. (1983) zeigten durch abwechselnde De- und Repletierungsphasen, daß die im β -Carotinmangel auftretenden genitalen Dysfunk-

tionen durch erneute Zufuhr von β -Carotin reversibel sind. BONSEMBIANTE et al. (1980; 1983a,b), HEINZ und HERZOG (1982) sowie RAKES et al. (1985) beschreiben übereinstimmend verbesserte Besamungsergebnisse bei β -Carotin-supplementierten Rindern.

Im Gegensatz zu diesen Berichten, die einen positiven Einfluß von β -Carotin auf die Fruchtbarkeit des Rindes beschreiben, stehen Veröffentlichungen, in denen trotz zum Teil ähnlicher Versuchsbedingungen kein derartiger Effekt festgestellt werden kann (FOLMAN et al., 1979; BINDAS et al., 1984; DUCKER et al., 1984; ASCARELLI et al., 1985; MARCEK et al., 1985; AKORDOR et al., 1986).

Die Bedeutung von β -Carotin im Fruchtbarkeitsgeschehen wird daher wohl solange umstritten bleiben, wie es nicht gelingt, die seiner Wirkung zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären.

Eine der hierzu aufgestellten Hypothesen geht auf die Beobachtungen zurück, daß der Gelbkörper des Rindes einerseits die höchste bisher gemessene Gewebekonzentration an β -Carotin aufweist (AHLSEWEDE & LOTTHAMMER, 1978) und andererseits zur höchsten Progesteronsynthese pro Gewichtseinheit fähig ist (HEAP et al., 1975). Die Ergebnisse von LOTTHAMMER (1978), daß im β -Carotinmangel eine verlangsamte Gelbkörperanbildung und eine herabgesetzte Progesteronsynthese auftreten und weiterhin eine Wechselbeziehung zwischen Blutcholesterin und dem β -Carotiningehalt sowie dem Reproduktionsgeschehen besteht (LOTTHAMMER & AHLSEWEDE, 1977), führten zu Vermutungen über einen Kausalzusammenhang zwischen diesen Faktoren. So hält JACKSON (1981) es für denkbar, daß der Transfer des Cholesterins, dem Ausgangsprodukt der Steroidsynthese, vom Blut in den Gelbkörper durch β -Carotin beeinflusst wird, da diese beiden Substanzen im Blut gemeinsam an Lipoproteine

gebunden transportiert werden. Als andere Möglichkeit betrachtet er ein direktes Eingreifen des β -Carotins in die ovarielle Steroidhormonsynthese. In diese Richtung weisen auch Untersuchungen von PETHES et al. (1985), die bei kultivierten Gelbkörperzellen β -Carotin-unterversorgter Kühe eine verminderte Progesteronsynthese finden.

Die von GAWIENOWSKI et al. (1974) demonstrierte Fähigkeit des bovinen Gelbkörpergewebes, β -Carotin zu Vitamin A zu spalten, gibt Anlaß zu der Vermutung, daß β -Carotin im Corpus luteum evtl. eine essentielle, lokale Provitamin-A-Funktion erfüllt. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Arbeit von SKLAN (1983b), in der weiterhin festgestellt wird, daß die spezifische Aktivität der carotinspaltenden Enzyme im Gelbkörper zyklusabhängigen Schwankungen unterworfen ist. In die gleiche Richtung weisen Untersuchungen von SCHWEIGERT et al. (1986). Sie stellen fest, daß der Vitamin-A-Gehalt in der Follikelflüssigkeit jeweils eines der großen Follikel jeden Ovarienpaares deutlich höher liegt wie in allen anderen Follikeln. Die Autoren vermuten, daß diesem Vitamin-A-Anstieg eine enzymatische Spaltung von β -Carotin im Follikel zugrunde liegt, wobei dem so veränderten Vitamin-A-Gehalt in der Follikelflüssigkeit eine Bedeutung bei der Reifung der Oozyte zugemessen wird.

Einen weiteren Ansatzpunkt bietet die von SCHAMS et al. (1977) festgestellte verzögerte Ovulation bei β -Carotinmangeltieren. Hierzu vermuten die Autoren, daß evtl. bestimmte proteolytische Enzyme, die zur Auslösung der Ovulation wichtig sind, nur vermindert synthetisiert werden.

2.1.2.2 Andere Tierarten

Berichte über positive Auswirkungen von β -Carotin auf das Fruchtbarkeitsgeschehen des Rindes führten dazu, daß auch bei anderen Tierarten ein möglicher Einfluß von β -Carotin auf die Reproduktionsleistungen untersucht wurde.

AHLWEDE und KONERMANN (1980) konnten durch parenterale Applikation von β -Carotin an zyklusgestörte **Stuten** verbesserte Befruchtungsergebnisse erzielen. HOLST et al. (1984) fanden bei β -Carotin-supplementierten Ponystuten stärkere Brunstsymptome, höhere Trächtigkeitsraten und ein selteneres Auftreten von embryonalem Fruchttod. Eine höhere Zahl an lebend geborenen Fohlen gegenüber den Kontrollen beschreiben ARBEITER und LORIN (1986). Im Gegensatz dazu stehen auch beim Pferd Berichte von EITZER und RAPP (1985) sowie von KLEMT (1986), die keinen meßbaren Einfluß einer β -Carotin-Zulage auf verschiedene Fruchtbarkeitsparameter feststellen können.

Für das **Schwein** (FIEDLER, 1984) und das **Kaninchen** (KORMANN & SCHLACHTER, 1984) werden höhere Wurfgrößen in β -carotinreich gefütterten Versuchsgruppen beschrieben. Keinen Einfluß von β -Carotin auf die Reproduktionsleistungen können hingegen CHEW & ARCHER (1983) bei der **Ratte** finden.

2.1.3 β -Carotin und Krebs

Eine weitere Wirkung von β -Carotin wird im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren diskutiert. So kamen PETO et al. (1981) nach der Auswertung weltweiter epidemiologischer Studien zu dem Schluß, daß eine eindeutige

negative Korrelation zwischen der β -Carotinaufnahme und dem Krebsrisiko beim Menschen besteht.

Zahlreiche experimentelle Untersuchungen zeigen, daß die Zufuhr von β -Carotin einen signifikanten Schutz von durch UV-B-Bestrahlung und durch chemische Karzinogene induzierten Hauttumoren bietet (EPSTEIN, 1977; SANTAMARIA et al., 1980; MATHEWS-ROTH, 1982). Daneben stellte sich heraus, daß auch transplantierte sowie virusinduzierte Tumoren bei Mäusen, die mit β -Carotin versorgt wurden, wesentlich seltener angingen als bei den Kontrolltieren (RETTURA et al., 1982; SEIFTER et al., 1982). Die Autoren beschreiben außerdem, daß sich bereits klinisch manifest gewordene Tumoren unter einer β -Carotin-Supplementierung langsamer weiterentwickeln und eine deutlich höhere Regressionsrate aufweisen.

Eine mögliche Anwendung von β -Carotin als Schutzmedikation bei tumortherapeutischen Bestrahlungen erschlossen SEIFTER et al. (1983). Sie demonstrierten, daß es im Gegensatz zu anderen Substanzen, die zu diesem Zweck verwendet werden, unerwünschte Bestrahlungsfolgen vermindert, ohne zugleich den Bestrahlungserfolg zunichte zu machen. Darüber hinaus scheint es zu einem additiven Behandlungseffekt zu kommen. Von besonderer Bedeutung für eine mögliche therapeutische Anwendung von β -Carotin ist dabei, daß von dieser Substanz keinerlei gesundheitsschädliche Nebenwirkungen zu erwarten sind (HEYWOOD et al., 1985). Auch eine Hypervitaminose A ist nicht zu befürchten, da mit zunehmendem Angebot die Umwandlungsrate von β -Carotin zu Vitamin A stark abfällt (MATHEWS-ROTH, 1982).

Die Mechanismen, nach denen β -Carotin im Krebsgeschehen eingreift, sind noch nicht geklärt. PETO et al. (1981) formulieren die drei folgenden Möglichkeiten:

- 1) Direkter Einfluß auf die Zelldifferenzierungsvorgänge
- 2) Umwandlung im Zielgewebe zu Vitamin-A-wirksamen Molekülen
- 3) Schutz der Zelle durch Inaktivierung reaktiver Moleküle sowie durch Verstärkung immunologischer Funktionen

Besonders zum letzten Punkt liegen zahlreiche Hinweise vor. So gilt β -Carotin als einer der wirksamsten Quencher von Singlett-Sauerstoff (1O_2). Außerdem ist es in der Lage, freie Radikale abzufangen (PETO et al., 1981; KRINSKY & DENEKE, 1982; SEIFTER et al., 1984). Diese Substanzen entstehen in der Zelle gehäuft unter der Einwirkung ionisierender Strahlen, aber auch bei anderen Gewebeirritationen. In Kettenreaktionen führen sie dann zu weiteren Radikalen, Membranperoxidationen und zu Zellmutationen, die letztlich zu Tumoren führen können. Diese Fähigkeit von β -Carotin, freie Radikale abzufangen, macht man sich in der Therapie der erythropoietischen Protoporphyrrie und anderer Photosensibilitätserkrankungen des Menschen bereits zunutze (MATHEWS-ROTH, 1982). Interessanterweise besteht die antioxidative Wirkung von β -Carotin besonders in Geweben mit niedrigem Sauerstoffpartialdruck. Es zeigt damit einen komplementären Effekt zum Tocopherol, dessen antioxidative Wirkung eher in Geweben mit hohem Sauerstoffpartialdruck eine Rolle spielt (BURTON & INGOLD, 1984).

Daneben scheint β -Carotin über das Interferon eine Veränderung der Abwehrleistung zu bewirken und damit die Tumorabwehr eventuell auch auf immunologischer Basis beeinflussen zu können (RHODES, 1983).

2.2 Carotinase (β -Carotin-15,15'-dioxygenase)

2.2.1 Untersuchungen in vivo

Die Fähigkeit tierischer Organismen, Carotin in Vitamin A umzuwandeln, wies erstmals MOORE (1930) nach. Er zeigte, daß es nach Verfüttern großer Carotindosen an Ratten zu einem deutlichen Anstieg des Vitamin-A-Gehaltes der Leber kommt. In der Folgezeit gelang es durch ähnliche Versuchsanordnungen, diese Umwandlung bei den meisten anderen Säugetieren (TIEWS, 1963) sowie beim Menschen (GOODMAN et al., 1966a) und zwei Fischarten (GROSS & BUDOWSKI, 1966) zu demonstrieren. Lediglich dem bis zu 6 Wochen alten Kalb (LUNDQUIST & PHILLIPS, 1943) und der Katze (GERSHOFF et al., 1957; LAKSHMANAN et al., 1972) fehlt diese Fähigkeit offenbar.

Die Frage nach dem Ort der Umwandlung war lange Zeit umstritten. MOORE (1930) hatte aus dem von ihm beobachteten Vitamin-A-Anstieg in der Leber gefolgert, daß diese selbst das Vitamin-A-bildende Organ sein müßte. Dagegen konnten SEXTON et al. (1946) zeigen, daß Vitamin-A-Mangelratten nach intraperitonealer Injektion von kolloidal gelöstem β -Carotin starben, während sie bei oraler Applikation am Leben blieben. Die Autoren folgerten daraus, daß der Darm der primäre Ort der Umwandlung sein müsse, was bald von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt werden konnte.

Auch andere Umwandlungsorte erscheinen möglich. So fand GREENBERG (1957) durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen eine Vitamin-A-Bildung aus β -Carotin in Talgdrüsen bei Ratte und Mensch. BIERI und POLLARD (1954) berichteten, daß intravenös verabreichtes β -Carotin von Ratten selbst nach Entfernung von Dünndarm, Nieren oder Teilen der Leber meßbar in Vitamin A umgewandelt wird.

Gleichartige Versuche der Arbeitsgruppe um WORKER (1957), bei denen neben den obengenannten Organen auch Magen, Dickdarm, Pankreas, Nebennieren, Gonaden, Schilddrüse oder Lungen entfernt wurden, führten die Autoren zu dem Schluß, daß die Fähigkeit zur Umwandlung von β -Carotin in Vitamin A nicht die Funktion eines einzelnen Organs oder Gewebes, sondern von vielen sein müßte.

2.2.2 Untersuchungen in vitro

Die Unsicherheiten bei der Bestimmung des Umwandlungsortes in vivo wie auch die Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus hatten schon frühzeitig zu in-vitro-Experimenten Anlaß gegeben. So berichteten OLCOTT und McCANN bereits 1931, sie hätten aus Rattenlebern ein Enzym isoliert, das Carotin in Vitamin A umwandelt. Obwohl sich diese Behauptung als nicht haltbar erwies (WOOLF & MOORE, 1932), wurde doch der von diesen Autoren geprägte Begriff "Carotinase" für ein - zunächst noch - hypothetisches Enzym, das Carotin zu Vitamin A spaltet, bald übernommen. Trotz vielfältiger Versuche war es aber lange Zeit nicht möglich, die Reaktion in isolierten Organen oder Homogenaten nachzuweisen (Übersicht bei GANGULY & MURTHY, 1967).

Erst 1965 gelang es dann zwei Arbeitsgruppen, unabhängig voneinander die in vitro Spaltung von ^{14}C - β -Carotin zu ^{14}C -Retinal durch Enzyme, die aus Homogenaten der intestinalen Mukosa (GOODMAN & HUANG, 1965) bzw. der Leber (OLSON & HAIYASHI, 1965) gewonnen worden waren, zu demonstrieren. Beide Berichte stimmen darin überein, daß die wirksamen Enzyme im Zytoplasma der Zellen lokalisiert sind und im leicht alkalischen Bereich ihr pH-Optimum haben. Sie werden von Glutathion stimuliert und von SH-bindenden Reagenzien gehemmt. Die Reaktion benötigt molekularen Sauerstoff und bildet als primäres Spaltprodukt Retinal.

Erhebliche Unterschiede wurden jedoch in den Umwandlungsraten gefunden. Eine Übersicht hierzu wie über die seither auch bei anderen Spezies und Organen beschriebenen Nachweise der Carotinase zeigt Tabelle 1. Um hierin die zum Teil sehr unterschiedlich formulierten Ergebnisse der einzelnen Autoren bezüglich der erzielten Umwandlungsraten miteinander vergleichen zu können, wurden die vorgegebenen Daten jeweils auf % Vitamin A/mg Protein umgerechnet. Wo Angaben zum Proteingehalt des Enzymansatzes fehlten, wurde dieser anhand vergleichbarer Arbeiten anderer Autoren sowie eigener Meßwerte geschätzt.

2.2.3 Mechanismus

Über den Mechanismus, nach dem β -Carotin zu Vitamin A abgebaut wird, gibt es widersprüchliche Theorien. Es wird dabei die Umwandlung über eine zentrale, eine terminale sowie über eine zufällige Spaltung des β -Carotinmoleküls diskutiert.

2.2.3.1 "Zentrale Spaltung"

KARRER et al.(1930; 1931) hatten nach Klärung der Strukturformeln rein formal vermutet, daß ein Molekül β -Carotin unter Addition von zwei Molekülen H_2O an der zentralen Doppelbindung zu zwei Molekülen Vitamin A gespalten wird.

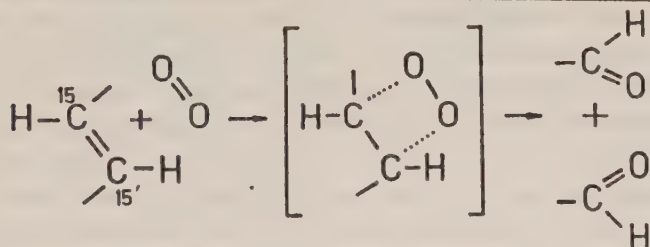
Im Gegensatz dazu stand die Beobachtung von GOODMAN und HUANG (1965) sowie OLSON und HAIYASHI (1965), daß für den Ablauf der Reaktion molekularer Sauerstoff nötig war. Sie schlossen daraus auf eine oxidative Spaltung des β -Carotinmoleküls an der zentralen Doppelbindung und gaben der Carotinase daher die genauere Bezeichnung β -Carotin-15,15'-dioxygenase (EC 1.13.11.21).

Tabelle 1: Übersicht über die bisher geführten Nachweise
des Enzyms Carotinase

Autor	Species Organ	eingesetzte Carotinmenge in µg	Umwandlungsrate*	
			nmol Vitamin A pro mg Protein	8 Vitamin A
GOODMAN & HUANG, 1965	Ratte	0,8 - 1	1,19	30 - 50
GOODMAN & OLSON, 1969	Darm			
OLSON & HAYAISHI, 1965	Ratte			
	Leber	18	0,28	0,42
	Darm		0,005	0,29
	Niere	0,5 - 3	0,001	0,05
FIDGE et al., 1969	Schwein			
	Darm	0,6	0,056	2,58
	Rind, Schaf			
	Darm	0,6	0,0	0,0
GRONOWSKA-SENGER & WOLF, 1969	Ratte			
	Darm	0,8	0,01 - 0,03	0,35 - 1,0
	Mensch			
	Darm	0,8	0,02 - 0,046	0,67 - 1,54
LAKSHMANAN et al., 1968	Kaninchen			
	Darm	27	0,09 - 0,18	0,18 - 0,36
LAKSHMANAN et al., 1972	Kaninchen			
	Darm		0,03	0,03
	Meerschweinchen, Schildkröte, Affe, Huhn	54		
	Darm		0,02 - 0,10	0,02 - 0,10
	Katze			
	Darm		0,0	0,0
SINGH & CAMA, 1974	Meerschweinchen			
	Darm	108	3,3	0,83
SKLAN, 1983a	Huhn			
	Darm	0,5	0,03	1,4
SKLAN, 1983b	Rind			
	Gelbkörper	0,5	0,88	47,3
	Darm		0,32	17,2
VILLARD & BATES, 1986	Ratte			
	Darm	0,8	0,04	1,34

*Maximalwerte oder Spanne

Abb. 3: Mechanismus der Carotinspaltung nach GOODMAN et al. (1966b)



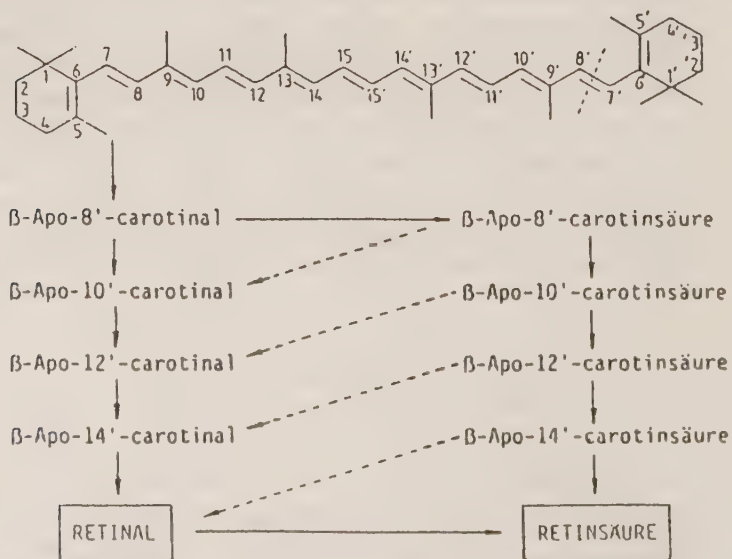
Der Einbau von molekularem Sauerstoff konnte bald mit Hilfe von ^{18}O durch VARTAPETIAN et al. (1966) bestätigt werden. Die sich jedoch aus einer zentralen Spaltung des β -Carotinmoleküls stöchiometrisch ergebende Umwandlung von einem Mol β -Carotin zu zwei Mol Vitamin A wurde dagegen nur durch GOODMAN und HUANG (1965) und SINGH & CAMA (1974) beschrieben. Alle anderen Untersucher fanden stets deutlich geringere Umwandlungsraten. Auch im Wachstumstest konnte nur ein Mal (KOEHN, 1948) die biologische Äquivalenz von 1 g β -Carotin zu 1 g Vitamin A demonstriert werden. Die Mehrzahl der Untersucher fand dagegen nur eine Wirksamkeit im Verhältnis 2:1, was sich letztlich auch in der WHO-Definition für eine Internationale Einheit (I.E.) Vitamin A entsprechend 0,6 g β -Carotin oder 0,3 g Retinol, niederschlug. Aus jedem Molekül β -Carotin scheint demnach nur jeweils ein Molekül Vitamin A entstehen zu können.

2.2.3.2 "Terminale Spaltung"

ZECHMEISTER et al. (1943) erklärten auf Grund von Elektronendichtebestimmungen, daß die zentrale Doppelbindung eines konjugierten Systems stabiler sein müßte als die terminalen, was eine primär zentrale Spaltung von

β -Carotin unwahrscheinlich erscheinen läßt. Diese Überlegungen wurden durch chemische Untersuchungen bestätigt, in denen gezeigt werden konnte, daß β -Carotin unter Oxidationsbedingungen an einer der terminalen Doppelbindungen (7,8 oder 7',8') geöffnet wird (GLOVER & REDFEARN, 1954). Diese Autoren konnten weiterhin in vivo den Abbau von β -Apo-8'-, β -Apo-10'- und β -Apo-12'-carotinal zu Vitamin A nachweisen. Basierend auf diesen Ergebnissen formulierten sie einen der β -Oxidation ähnlichen Mechanismus der β -Carotinspaltung, der in Abbildung 4 dargestellt ist.

Abb. 4: Abbau von β -Carotin nach dem Glover-Redfearn-Schema



Die oxidative Spaltung der terminalen Doppelbindung führt nach diesen Vorstellungen zuerst zu β -Apo-8'-carotinal, das dann schrittweise zum Retinal abgebaut wird. Die β -ständige Methylgruppe des Retinals verhindert dann den Fortgang der Reaktion. Als weitere Möglichkeit erwägen die Autoren die direkte Oxidation von β -Apo-8'-carotinal zu β -Apo-8'-carotinsäure, die dann entsprechend zu Retinsäure abgebaut würde.

Zahlreiche Autoren identifizierten bei in-vivo-Experimenten sowohl Apocarotinale als auch Apocarotinsäuren und unterstützen damit die Glover-Redfearn-Hypothese der terminalen Spaltung von β -Carotin (THOMMEN, 1961; WILDFEUER, 1969; HASANI & PARRISH, 1972; SHARMA et al., 1976; 1977).

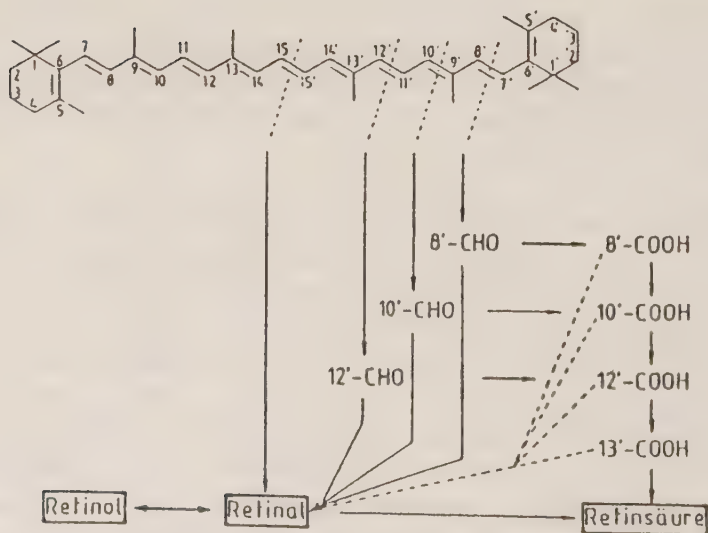
2.2.3.3 "Zufällige Spaltung"

Ein wesentlicher Ansatzpunkt der Kritik am Glover-Redfearn-Schema ist die Tatsache, daß bislang weder eine biochemische noch eine enzymatische Transformation höherer Isoprenoid-Aldehyde zu niederen Aldehyden jemals nachgewiesen werden konnte.

Basierend auf dieser Überlegung und unterstützt durch eigene Studien über die biologische Wirksamkeit verschiedener β -Apocarotinale einerseits und die nach der Verfütterung von β -Carotin und β -Apo-8'-carotinal aus dem Dünndarm isolierbaren Apocarotinale bzw. Apocarotinsäuren andererseits formulierten SHARMA et al. (1976; 1977) einen weiteren Mechanismus des β -Carotinabbaus (Abb.5). Danach greift die Dioxygenase unspezifisch an irgendeiner Doppelbindung des β -Carotinmoleküls an, wobei das entsprechende β -Apocarotinal oder Retinal entsteht. Die Apocarotinale können ihrerseits zu Retinal gespalten oder zur

entsprechenden Apocarotinsäure oxidiert werden. Diese werden wiederum in einem der β -Oxidation analogen Prozeß zur Retinsäure abgebaut oder direkt in Retinal übergeführt. Diese Theorie des β -Carotinabbaus wird durch eine neuere Arbeit von GOSWAMI und BRITTON (1987), bei der nach Inkubation von Enzympräparationen aus Kaninchendärmen mit β -Carotin über HPLC verschiedene Bruchstücke identifiziert werden konnten, die auf eine exzentrische Spaltung des Moleküls hinweisen, unterstützt.

Abb. 5: Abbau von β -Carotin durch "zufällige Spaltung" nach SHARMA et al. (1977)



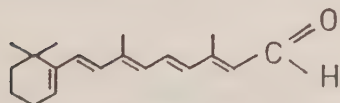
Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der oder die genauen Mechanismen der Umwandlung von β -Carotin zu Vitamin A bislang noch nicht zweifelsfrei geklärt werden konnten. Es überwiegen jedoch die Hinweise darauf, daß das Carotin nicht spezifisch an der zentralen Doppelbindung gespalten wird, sondern daß auch ein Abbau von einer anderen Stelle des Moleküls her erfolgt (Übersicht bei GANGULY & SASTRY, 1985).

2.3 Vitamin A

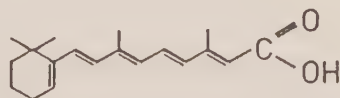
2.3.1 Stoffwechsel

Vitamin A kommt im tierischen Organismus in vier Formen vor (Abb. 6), nämlich als Alkohol (Retinol), als Aldehyd (Retinal), als Säure (Retinsäure) sowie als Ester langkettiger Fettsäuren (Retinylester).

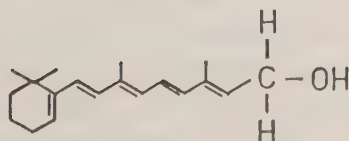
Abb. 6: Vitamin-A-Metabolite im Säugetierstoffwechsel



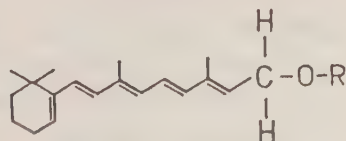
RETINAL



RETINSÄURE



RETINOL



RETINYLESTER

Die enterale Resorption von Retinol erfolgt über einen carriervermittelten Prozeß (HOLLANDER, 1981). In der Mukosazelle wird Retinol mit langkettigen Fettsäuren verestert und gelangt, gebunden an Chylomikronen, via Lymphe und Blut in die Leber. Dort wird es umverestert und überwiegend als Palmitat gespeichert.

Retinal, das in der Mukosazelle aus Carotinoiden entsteht, wird sofort zu Retinol reduziert, verestert und entsprechend weitertransportiert (FIDGE & GOODMAN, 1968).

Aus dem Leberspeicher durch Hydrolyse freigesetztes Retinol wird im Blut in einem Komplex mit dem Retinol-bindenden Protein (RBP) transportiert, an den zudem zum Schutz vor glomerulärer Filtration das Transthyretin (TTR, ehemals Präalbumin) angelagert wird. Neben seiner Funktion als Transportprotein stellt das RBP auch einen Schutzfaktor vor einer Vitamin-A-Intoxikation dar und ist darüberhinaus wesentlich an der strengen Homöostase der Vitamin-A-Konzentration im Serum beteiligt (SMITH & GOODMAN, 1979).

Spezifische Rezeptoren an den Zellen der Zielgewebe binden den Retinol-RBP-TTR-Komplex. Innerhalb der Zelle wird Retinol dann von einem zellulären RBP übernommen (CHYTIL & ONG, 1979).

Über den Stoffwechsel der Retinsäure ist wenig bekannt. Sie wird im Blut an ein Serumalbumin gekoppelt transportiert (SMITH et al., 1973), konnte bisher jedoch noch in keinem anderen Gewebe nachgewiesen werden (WOLF, 1984). Da sie weder zu Retinal oder Retinol reduziert noch gespeichert werden kann, wurde sie vor allem als Abbau- und Ausscheidungsprodukt dieser Vitamin-A-Formen angesehen. Inzwischen gilt es jedoch als sicher, daß sie einen eigenständigen, wirksamen Vitamin-A-Metaboliten darstellt

(OTT & LACHANCE, 1979). Der Nachweis eines zellulären Retinsäure-bindenden Proteins bekräftigt diese Auffassung (CHYTIL & ONG, 1979).

2.3.2 Funktionen

Vitamin A erfüllt im Organismus vielfältige Funktionen. Es ist unerlässlich für das normale Körperwachstum, insbesondere die Knochenentwicklung und die Differenzierung epithelialer Gewebe. Letzteres führte zu dem Namen "Epithelschutzvitamin". Ein Mangel an Vitamin A führt bei beiden Geschlechtern zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Reproduktionsleistungen, was unter anderem auf eine Störung der Steroidbiosynthese zurückzuführen ist (JUNEJA et al., 1966). Auf molekularer Ebene am genauesten erforscht ist jedoch seine Funktion beim Sehprozeß (WALD, 1968). In den letzten Jahren häufen sich zudem Berichte über eine mögliche anticancerogene Wirkung (SPORN & ROBERTS, 1984).

Interessanterweise kann Retinsäure als alleinige Vitamin-A-Quelle weder Erblindung noch Sterilität verhindern. Sie gewährleistet jedoch normales Körperwachstum und Epitheldifferenzierung (DeLUCA, 1979).

2.3.3 Wirkungsweise

Die Suche nach einem einheitlichen Wirkprinzip, das alle dargestellten Funktionen erklären hilft, erwies sich bei Vitamin A als zu restriktiv. Heute sind bislang drei unabhängige Ansatzpunkte bekannt:

- 1) Die von WALD (1968) detailliert aufgeklärte Funktion im Sehvorgang, bei dem es zu einer photoinduzierten

Stereoisomerisierung der 11-cis- zur all-trans-Form des Retinals kommt. Die damit verbundene Konformationsänderung im Proteinanteil des Sehpigments Rhodopsin führt über eine Änderung der Permeabilität der Sehzellmembran zur Auslösung eines Nervenimpulses.

- 2) Eine Bedeutung bei der Erhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität von Membranen, wobei dem Retinolphosphat eine Koenzymfunktion bei der Synthese von Glykoproteinen zukommt. Hierzu kann es ähnlich wie das Dolichol über die Bildung eines Glykolipidintermediates den Transport der hydrophilen Kohlenhydrate zur - offenbar lipophilen - Bindungsregion im Protein ermöglichen (LÖFFLER et al., 1979; SHIDOJI & DeLUCA, 1981; WOLF, 1984).
- 3) Die Kontrolle der Genexpression nach einem den Steroidhormonen ähnlichen Mechanismus. CHYTIL & ONG (1979) stellten fest, daß Retinol und Retinsäure in der Zelle mit ihren Bindungsproteinen in den Kern gelangen, der seinerseits spezifische Bindungsstellen aufweist (TAKASE et al., 1979). Sie können dadurch die m-RNA- und damit die Proteinsynthese der Zelle beeinflussen (Übersicht bei WOLF, 1984).

2.4 Der Follikel

2.4.1 Reifung und Differenzierung: Follikulogenese

Die Entwicklung der Follikel beginnt bereits zur Zeit der Geburt mit der Umhüllung der Oozyte durch eine einschichtige Lage von Granulosazellen. Der dabei entstehende Primordialfollikel ist durch eine sehr dünne Basalmembran vom umgebenden ovariellen Bindegewebe abgegrenzt und ver-

bleibt bis zum Wirksamwerden hormoneller Stimuli, die mit Beginn der Pubertät auftreten, in einem Zustand völliger morphologischer Inaktivität (CRAN & MOOR, 1980; GURAYA, 1985).

Der Anstoß zum weiteren Follikelwachstum basiert vermutlich auf einem frühen Gonadotropinstimulus (PETERS, 1978). Die zunächst flachen Granulosazellen werden isoprismatisch (Primärfollikel) und zeigen eine hohe Mitoserate, wodurch die Oozyte bald von einer mehrschichtigen Granulosazellschicht umgeben wird (Sekundärfollikel). Gleichzeitig bildet sich um die Oozyte eine Glykoproteinschicht, die Zona pellucida. Diese wird von zahlreichen Zellfortsätzen der Granulosa durchbrochen, die damit direkten Kontakt mit der Oozyte aufnehmen (CRAN & MOOR, 1980; GURAYA, 1985). Sobald sich 5-6 Lagen von Granulosazellen gebildet haben, entstehen zwischen ihnen flüssigkeitsgefüllte Spalten, die sich zu einem einheitlichen Hohlraum, der Follikelhöhle (Antrum) vereinigen. Der Sekundärfollikel wird damit zum Tertiärfollikel oder Graaf'schen Follikel. Gleichzeitig bildet das umgebende Bindegewebe unter dem Einfluß der Granulosazellen die zweischichtige Theka folliculi.

Unter dem fein abgestimmten Einfluß der hypophysären Gonadotropine LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikel stimulierendes Hormon) wird der wachsende Follikel zu einem wichtigen Hormonbildner. Zunächst bilden die Zellen der Theka interna unter LH-Einfluß Androgene. Diese werden in den Granulosazellen durch eine FSH-stimulierte steigende Aromataseaktivität in wachsendem Umfang zu Östrogenen metabolisiert. Diese stimulieren ihrerseits durch ihre mitosefördernden Eigenschaften das weitere Follikelwachstum und fördern außerdem synergistisch zum FSH die Ausbildung von LH-Rezeptoren an den Granulosazellen. Die Granulosazellen produzieren daneben Wirkstoffe, die direkt oder indirekt über eine Hemmung der FSH-Freisetzung das

Wachstum weiterer Follikel hemmen. Sobald die Östrogenkonzentration im Serum einen gewissen Schwellenwert erreicht hat, bewirkt sie eine massive LH-Ausschüttung aus der Hypophyse. Die Bindung von LH an die Granulosazellen beendet die Östrogensekretion sowie das Follikelwachstum und regt die Progesteronproduktion an. Gleichzeitig treten morphologische Veränderungen an Membrana basalis, Membrana granulosa und Theka auf, die wahrscheinlich Ausdruck einer enzymatischen Auflösung dieser Strukturen durch eine von den Thekazellen gebildete Kollagenase sind. Diese münden in einem Bruch der Follikelwand und der Ovulation der Eizelle (MOOR, 1977; THIBAUT, 1977; ERICKSON & HSUEH, 1978; ESPEY, 1978; RICHARDS, 1978; CRAN & MOOR, 1980; DIELEMANN et al., 1983; LEDWITZ-RIGBY & RIGBY, 1983; McNATTY et al., 1984; TSONIS et al., 1984; IRELAND & ROCHE, 1987).

Die große Mehrheit der ovariellen Follikel kommt allerdings nie zur Ovulation, sondern verfällt vorher der Atresie. Dieser Prozeß beginnt mit einer Degeneration und Ablösung der Granulosazellen und dem Kontinuitätsverlust der Basalmembran (KRUIP & DIELEMANN, 1982) und endet in der Auflösung von erkennbaren Follikelstrukturen. Bereits vor Beginn dieser morphologisch faßbaren Veränderungen kommt es zu funktionellen Ausfallserscheinungen speziell der Granulosazellen, weshalb die Bestimmung des Androgen/Östrogen-Verhältnisses in der Follikelflüssigkeit es ermöglicht, schon früheste Stadien der Atresie zu erkennen (KRUIP & DIELEMANN, 1982; PEUKERT-ADAM et al., 1984).

Obwohl der chronologische Ablauf der Ereignisse, die letztlich zur Ovulation auf der einen bzw. zur Atresie auf der anderen Seite führen, relativ genau bekannt ist, herrscht noch immer Unklarheit darüber, welche selektiven Mechanismen für den Zeitpunkt und die Entwicklung der

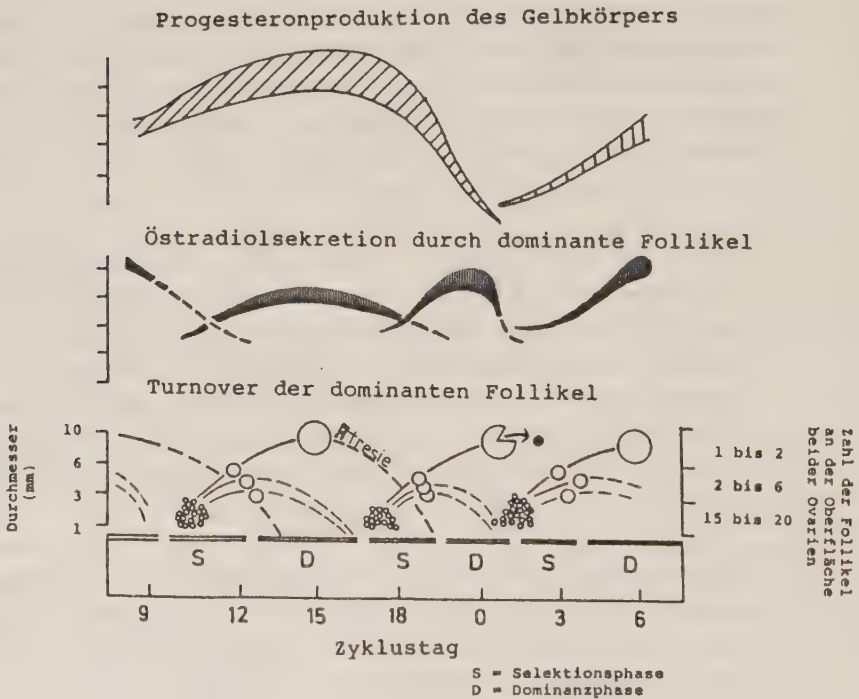
Follikel in der einen oder anderen Richtung verantwortlich sind.

RICHARDS (1978) sowie CRAN und MOOR (1980) vermuten, daß täglich einige Primordialfollikel in den Wachstumspool eintreten. Diesem ständigen "Durchfluß" wachsender Follikel ist ein zyklisches Schema zirkulierender Hormone übergeordnet. Nach dieser Theorie entwickeln sich dann nur diejenigen Follikel, die einen FSH- und/oder LH-Stimulus in einer kritischen Phase ihres Wachstums erhalten, normal weiter und ovulieren letztlich. Alle anderen Follikel, deren Wachstum nicht synchron zu diesen Stimuli verläuft, gehen zugrunde.

IRELAND & ROCHE (1987) dagegen folgern aus ihren Untersuchungen, daß während eines Zyklus beim Rind mindestens drei "Wellen" follikulären Wachstums stattfinden, die alle in einem dominanten, d.h. östrogenaktiven Follikel gipfeln (Abbildung 7). Nur derjenige Follikel jedoch, dessen Dominanzphase mit der Regression des Corpus luteum zusammenfällt, gelangt zur Ovulation, während alle anderen atretisch werden.

LEDWITZ-RIGBY & RIGBY (1983) kamen nach Untersuchungen an Schweineovarien zu dem Schluß, daß jeweils nur einer von fünf morphologisch gleichen kleinen Follikel (1-2 mm) einen "Stimulator" enthält, der es seinen Granulosazellen erst ermöglicht, auf hormonelle Stimuli von Seiten der Hypophyse zu reagieren und damit bis zur Ovulation reifen zu können. Die anderen vier hingegen enthalten einen "atretogenen Faktor", der die Granulosa für gonadotrope Stimuli unempfindlich macht. Diese Follikel können kein Östrogen bilden und verfallen der Atresie.

Abbildung 7: Schema zur Entwicklung der dominanten Follikel während eines Zyklus beim Rind (IRELAND & ROCHE, 1987)



2.4.2 Reifung der Oozyte

Die dem Dottersackentoderm entstammenden weiblichen Urkeimzellen wandern während der frühen Embryonalentwicklung in die indifferente Keimdrüsenanlage, wo sie sich intensiv teilen. Nach dieser kurzen Vermehrungsphase ist die Zahl der Keimzellen für den Rest des Lebens eines Individuums

festgelegt, d.h. es erfolgt keine weitere Vermehrung mehr (CRAN & MOOR, 1980). Noch vor der Geburt treten alle Oozyten in die erste Reifeteilung ein, setzen diese aber nur bis zum Diplotän fort. Anschließend wird die Kernumhüllung wieder ausgebildet, die Oozyte liegt im sogenannten Germinalvesikel-Stadium vor. In diesem Zustand meiotischer Ruhe verbleibt sie bis zur Reaktivierung beim geschlechtsreifen Tier (TSAFRIRI, 1978).

Erst kurz vor der Ovulation wird die Meiose fortgesetzt, wobei dem LH vermutlich eine aktivierende Rolle zukommt (TSAFRIRI, 1978; MOOR, 1978). In der Metaphase der 2. Reifeteilung erfolgt abermals eine Unterbrechung der Meiose, die nur im Falle einer Befruchtung zu Ende geführt wird.

Relativ unabhängig von diesen Vorgängen der Kernreifung verläuft daneben die Reifung des Zytoplasmas der Oozyte. Während nämlich die Meiose auch in vitro in der isolierten Oozyte spontan abläuft, was vermutlich durch den Wegfall eines von den Granulosazellen gebildeten Inhibitors bedingt ist (WIEL et al., 1983), zeigen die so gewonnenen Oozyten nach einer Befruchtung keine normale Weiterentwicklung (MOOR & TROUNSON, 1977). Dies liegt vermutlich in einer gestörten oder unvollständigen Proteinsynthese in der so gereiften Oozyte begründet (CRAN & MOOR, 1980). MOOR & WARNES (1978) konnten mit Hilfe von elektrophoretischen Untersuchungen zeigen, daß sich das Proteinstmuster in vivo gereifter Schafoozyten in charakteristischer Weise kontinuierlich veränderte, während in vitro außerhalb des Follikels gereifte Oozyten nach 15 Stunden noch ein unverändertes Ausgangsmuster aufwiesen. Diesen unreifen Oozyten fehlen unter anderem die Faktoren, die die Dekondensation und Ausbildung des männlichen Vorkernes nach der Penetration induzieren (THIBAULT, 1977). Die Plasmareifung ist offenbar - im Gegensatz zur Kernreifung - von der

Anwesenheit von Steroidhormonen, insbesondere Östrogenen, abhängig (CRAN & MOOR, 1980; MOOR et al., 1980).

2.4.3 Follikelflüssigkeit

Die Follikelflüssigkeit besteht zum einen aus Bestandteilen, die aus dem Blut transferiert werden, und zum anderen aus Produkten des Granulosazellstoffwechsels. Da sie in unmittelbarem Kontakt zur Oozyte und den Granulosazellen steht, wird vermutet, daß sie bei deren Funktion und Reifung eine wichtige Rolle spielt. Durch die avaskuläre Membrana granulosa und Membrana basalis ist sie vom Blut getrennt, was den Aufbau eines ganz spezifischen Milieus ("Microenvironment") innerhalb des Follikels ermöglicht. Die Wechselbeziehungen zwischen diesen beiden Kompartimenten sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

2.4.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Follikelflüssigkeit ist klar, leicht viskös und gelblich. Spezifisches Gewicht, osmotischer Druck und pH-Wert entsprechen weitgehend den jeweiligen Serumwerten (CARAVAGLIOS & CILOTTI, 1957; DAVID et al., 1973; EDWARDS, 1974; McNATTY, 1978).

2.4.3.2 Elektrolyte

Während für Magnesium, Calcium, Chlorid, Zink und Kupfer übereinstimmend angegeben wird, daß sich die Konzentrationen in Follikelflüssigkeit und Serum gleichen (McNATTY, 1978), liegen für Kalium und Natrium widersprüchliche Ergebnisse vor. SHALGI et al. (1972) sowie EDWARDS (1974) finden beim Menschen keine Unterschiede zwischen Serum und

Follikelflüssigkeit. Dagegen beschreiben PASCU et al. (1969) sowie DAVID et al. (1973) beim Rind bzw. Kaninchen leicht erhöhte Natrium- und signifikant höhere Kaliumgehalte in der Follikelflüssigkeit. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei den hohen Kaliumwerten um postmortal bedingte Veränderungen handelt (KNUDSEN et al., 1979).

2.4.3.3 Proteine

Der Proteingehalt in der Follikelflüssigkeit beträgt beim Rind etwa 80 % der Serumkonzentration. Dieser Wert ist unabhängig von der Größe der Follikel. Immunologische und elektrophoretische Untersuchungen zeigen, daß zwischen den Proteinen des Plasmas und der Follikelflüssigkeit keine qualitativen Unterschiede bestehen (CARAVAGLIOS & CILOTTI, 1957; DESJARDINS et al., 1966; ANDERSEN et al., 1976). Dagegen unterscheiden sie sich quantitativ, d.h. hinsichtlich ihrer Konzentration in der Follikelflüssigkeit relativ zum Serum. Diese ist umgekehrt proportional zum Molekulargewicht, nicht jedoch zur Molekülgröße (SHALGI et al., 1973). Daraus schließen diese Autoren, daß die Blut-Follikelflüssigkeitsschranke wie ein "Molekularsieb" wirkt. Leichte Moleküle wie das Albumin können sich dadurch in der Follikelflüssigkeit über die Serumkonzentration hinaus anreichern, während sehr schwere Proteine wie die β -Lipoproteine (VLDL und LDL) gänzlich von der transfollikulären Passage ausgeschlossen werden.

2.4.3.4 Hormone

Eine klare Einschränkung der Molekularsieb-Theorie muß zumindest in Bezug auf die hormonelle Zusammensetzung der Follikelflüssigkeit gemacht werden. McNATTY (1978) weist

darauf hin, daß die beiden Proteohormone FSH und LH mit jeweils etwa 33.000 daltons zwar annähernd das gleiche Molekulargewicht haben, ihre relative Konzentration in der Follikelflüssigkeit sich mit bis zu 60 % beim FSH gegenüber maximal 30 % beim LH um den Faktor 2 unterscheiden. Er folgert daraus, daß auch die Form des Moleküls und seine Ladung einen Einfluß auf die Passagerate haben müßten.

Im Gegensatz zu den aus dem Blut stammenden Bestandteilen zeigen die Konzentrationen der Steroidhormone, die von den Granulosazellen produziert werden, in der Follikelflüssigkeit deutliche Abhängigkeiten von Follikelgröße und -qualität. Mit zunehmender Größe kommt es zu einem deutlichen Anstieg der 17 β -Östradiol-Konzentration bei gleichzeitiger Abnahme der Testosteron-Konzentration, wofür eine Zunahme der Granulosazellen und/oder der Aktivität der Aromatase verantwortlich ist (HENDERSON et al., 1982). Die Östradiol-Konzentration in der Follikelflüssigkeit kann dabei auf Werte ansteigen, die bis zu 40.000 mal höher sind als im Serum (McNATTY, 1978).

Diese massiven Änderungen der endokrinen Zusammensetzung sind eng mit der morphologisch faßbaren Qualität der Follikel korreliert und erlauben daher Aussagen über deren funktionellen Charakter (KRUIP & DIELEMANN, 1982). IRELAND und ROCHE (1983) kommen nach Auswertung zahlreicher Parameter zu dem Schluß, daß die Bestimmung des Verhältnisses der 17 β -Östradiol- zur Progesteron- und Androgenkonzentration in der Follikelflüssigkeit zuverlässige Aussagen darüber erlaubt, ob ein Follikel gesund (= östrogenaktiv) oder atretisch (= östrogeninaktiv) ist.

Der erst wenige Stunden vor der Ovulation stattfindende Anstieg der Progesteronkonzentration in der Follikelflüssigkeit weist bereits auf eine beginnende Umstellung

der Syntheseleistung der Granulosazellen in Richtung Luteinzellen hin (DIELEMANN et al., 1983).

2.4.3.5 Vitamine

Über den Vitamingehalt der Follikelflüssigkeit gibt es bisher erst wenige Untersuchungen. CERLETTI und ZICHELLA (1961) konnten beim Menschen die Vitamine B₁, B₂ und B₆ nicht nachweisen. Für Vitamin C zeigten PASCU et al. (1970), daß die Konzentration in der Follikelflüssigkeit des Rindes höher liegt wie im Serum.

Erste Untersuchungen auf β -Carotin und Vitamin A stammen von CHEW et al. (1984). Sie fanden in der gepoolten Follikelflüssigkeit des Rindes für β -Carotin 39 % und für Vitamin A 63 % der jeweiligen Serumkonzentrationen. Dies konnte durch erste Untersuchungen von SCHWEIGERT et al. (1986) bestätigt werden. In dieser Arbeit jedoch wurde zudem erstmals Follikelflüssigkeit von Follikeln unterschiedlicher Größen einzeln auf β -Carotin und Vitamin A untersucht. Dabei zeigten sich hinsichtlich der β -Carotin-Konzentrationen keine Unterschiede zwischen großen und kleinen Follikeln, wohingegen die Vitamin-A-Konzentration mit 75 % der Serumkonzentration in großen Follikeln erheblich über der der kleinen Follikel (51 %) lag. Weitere Untersuchungen ergaben, daß der Vitamin-A-Gehalt der Follikelflüssigkeit eng mit der 17 β -Östradiol-Konzentration und folglich mit der Qualität der Follikel korreliert ist (SCHWEIGERT & ZUCKER, 1988). Sie liegt in grossen, nicht atretischen Follikeln signifikant höher wie in Follikelzysten sowie kleinen und atretischen Follikeln. Da derartige Veränderungen einer Substanz mit der Qualität der Follikel für ein Vitamin bisher einmalig ist, vermuten

die Autoren, daß das Vitamin A für das Follikelwachstum und die Reifung der Oozyte von Bedeutung sein muß.

Eine Veränderung der Passagerate von RBP-TTR-gebundenem Retinol durch die Blut-Follikelflüssigkeitsschranke in Abhängigkeit von der Follikelqualität muß aufgrund der bisher bekannten Tatsachen als sehr unwahrscheinlich eingestuft werden. Daher postulieren die Autoren eine lokale Umwandlung von β -Carotin zu Vitamin A in den Granulosazellen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, in p.a. Qualität von der Firma Serva, Heidelberg bezogen. Glykocholsäure, Trypsininhibitoren, Retinsäure, Retinol und Retinal stammten von Sigma, München. Die Eluenten für die HPLC lieferte Rathburn, Walkerburn (Schottland).

15,15'-¹⁴C-markiertes β -Carotin wurde freundlicherweise von der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, zur Verfügung gestellt. Die spezifische Aktivität betrug 1,85 MBq (50 μ Ci)/mg.

3.2 Probengewinnung

Die Ovarien für die Untersuchungen wurden in der Zeit von Frühjahr 1986 bis Sommer 1987 am Schlachthof München gewonnen. Sie wurden Färsen und Kühen im Rahmen des Schlachtvorganges, etwa 10 Minuten nach der Tötung, entnommen und sofort in physiologischer Kochsalzlösung auf Eis gekühlt. Ovarien von Tieren, die sich nach den morphologischen Kriterien von IRELAND et al. (1980) eindeutig im Zyklusstadium IV (18.-20. Tag) befanden, wurden gesondert gesammelt. Keine Verwendung fanden Organe von Tieren mit erkennbaren pathologischen Veränderungen am Genitale sowie von graviden Tieren und Kühen im Puerperium.

Unmittelbar nach dem Transport in das Institut wurden die Ovarien auf Eis präpariert. Die Follikel wurden dabei entsprechend ihrem äußeren Durchmesser in zwei Kategorien

eingeteilt, nämlich in kleine Follikel mit einem Durchmesser von 2-5 mm und in große Follikel mit 10-20 mm Durchmesser. Follikel anderer Größen wurden für die Untersuchungen nicht verwendet.

Kleine Follikel wurden mit einer 0,65 mm starken Kanüle mit aufgesetzter Spritze punktiert und die Granulosazellen mit der Follikelflüssigkeit abgesaugt. Die so gewonnenen Flüssigkeiten wurden gepoolt und anschließend 10 min mit 600 g bei 4°C zentrifugiert, wodurch die Granulosazellen vollständig sedimentierten (CHANNING & LEDWITZ-RIGBY, 1974). Die überstehende Follikelflüssigkeit wurde dekantiert und für die Analysen auf Steroidhormone und Vitamine portioniert bei -20°C aufbewahrt.

Die Gewinnung der Follikelflüssigkeit großer Follikel erfolgte in gleicher Weise. Da jedoch durch einfache Punktion und Aspiration mit Nadel und Spritze nur ein sehr geringer Teil der Granulosazellen dieser Follikel gewonnen werden kann, wurden sie nach der Entleerung mit einer feinen Schere geöffnet. Danach wurde die Granulosa durch vorsichtiges Schaben mit einer Platinöse gelockert und die abgelösten Zellen durch dreimaliges Spülen mit H-Medium (0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8 mit 30 mM Nikotinsäureamid und 4 mM Magnesiumchlorid) mittels einer Pasteur-Pipette ausgewaschen. Die Spülflüssigkeit wurde wiederum zur Abtrennung der Granulosazellen 10 min mit 600 g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

In Vorversuchen sowie als Kontrollansätze bei den Enzymtests wurde Darmmukosa von Ratten (Sprague-Dawley) und Kaninchen (Weisse Neuseeländer) verwendet. Das erste Drittel des Dünndarms wurde hierzu unmittelbar nach der Tötung der über Nacht gefasteten Tiere entnommen und in eiskalte physiologische Kochsalzlösung verbracht. Es wurde in etwa 15 cm lange Abschnitte geteilt, diese längsseits

aufgeschnitten und gut ausgewaschen. Auf einer eisgekühlten Glasplatte wurde dann die Mukosa vorsichtig mit der Kante eines Objektträgers abgeschabt.

3.3 Enzympräparation

Die Präparation und Anreicherung der zytosolischen Enzymfraktion sowie die Inkubation der Enzymsätze erfolgte in Anlehnung an die von GOODMAN und OLSON (1969) für die Rattendarmmukosa beschriebenen Methode. Für einen Enzymsatz wurden Granulosazellen aus etwa 500-800 kleinen bzw. 20-40 großen Follikeln benötigt.

Die sedimentierten Granulosazellen wurden in der fünffachen Menge H-Medium resuspendiert und anschließend in einem Elvehjem-Potter mit Teflonpistill unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde 60 min in einer Beckmann L8-70 Ultrazentrifuge mit 104.000 g bei 4°C zentrifugiert. Der dabei gewonnene, enzymhaltige Überstand wird im Folgenden als Rohextrakt bezeichnet. Er konnte durch eine Ammoniumsulfat-Präzipitation weiter gereinigt und konserviert werden. Hierzu wurde eine vorgelegte Menge Rohextrakt im Eisbad unter ständigem Rühren tropfenweise mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung versetzt, bis die Gesamtlösung eine 55%ige Sättigung dieses Salzes aufwies. Nach weiterem Rühren über 20 min wurde die entstandene Suspension in der Ultrazentrifuge 20 min mit 10.000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen, das Pellet bei -20°C unter Stickstoff gelagert.

Die Enzympräparation aus der Darmmukosa erfolgte in gleicher Weise. Um Verluste durch darmeigene Proteasen zu verhindern, enthielt das H-Medium für diese Gewebe neben den oben angegebenen Bestandteilen zusätzlich 100 mg/l Trypsininhibitor aus Hühnereiweiß.

3.4 Bestimmung der Enzymaktivität

3.4.1 Lösungen

Das für eine Versuchsreihe benötigte 15,15'-¹⁴C- β -Carotin wurde jeweils am Vortag der Enzyminkubation frisch gereinigt. Hierzu mußten etwa 50 μ g β -Carotin zunächst in 500 μ l Isopropanol gelöst werden. Anschließend wurde die Lösung unter Stickstoffbegasung wieder getrocknet und das β -Carotin in 200 μ l Petroläther aufgenommen. Diese Lösung wurde mit Petroläther über eine 8 cm lange Säule aus 9 % wasser-inaktiviertem Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe III nach Brockmann in einer Pasteurpipette chromatographiert und damit von störenden Zerfallsprodukten befreit. Das eluierte β -Carotin wurde erneut unter Stickstoff zur Trockne eingengt und über Nacht bei -40°C unter Stickstoff gelagert. Erst kurz vor Gebrauch wurde es aufgetaut und in 200 μ l Isopropanol aufgenommen.

Am Vorabend der Inkubation wurden die Enzym-Ammoniumsulfat-Pellets aufgetaut und in jeweils 2 ml 0,01 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8) gelöst. Anschließend erfolgte eine 12-stündige Dialyse bei 4°C gegen einen zweihundertfachen Überschuß des Puffers, um das Ammoniumsulfat zu entfernen. Bei Enzympräparationen aus Darmmukosa wurde der Puffer zusätzlich mit 2 g/l TLCK (Tosyl-Lysin-Chloromethyl-Keton), einem Trypsininhibitor, versetzt.

Jeweils am Versuchstag wurden 45 mg Glutathion (reduziert) in 14 ml eines 0,2 M Kaliumphosphat-Puffers (pH 7,8) gelöst. Der Puffer enthielt zusätzlich 30 mM Nikotinsäureamid und 4 mM Magnesiumchlorid.

Kurz vor Versuchsbeginn wurde eine 1%ige (w/v) Eilecithin-Emulsion frisch hergestellt, indem 100 mg Eilecithin mit 10 ml Aqua bidest. 15 min auf einem mechanischen Rüttler gründlich durchmischt wurden.

Natrium-Glykocholat (88 mg) wurde in 200 μ l Aqua bidest. gelöst. Nach Zugabe von 600 μ l der 1%igen Eilecithin-Emulsion bildete sich durch kräftiges Schütteln auf einem Vortex-Gerät die gebrauchsfertige Glykocholat-Lecithin-Emulsion.

3.4.2 Enzymatische Umsetzung

Die Glykocholat-Lecithin-Emulsion wurde in einem 20 ml-Becherglas mit Magnetührstab vorgelegt und unter ständigem Rühren tropfenweise mit der β -Carotin-Lösung versetzt. Dann wurde unter weiterem Rühren die Glutathion-Lösung hinzugefügt und das Ganze gut durchmischt. Aus dieser Emulsion wurden je 1 ml in 25 ml- Erlenmeyer-Kölbchen pipettiert und die Reaktionen durch Zusatz von je 1 ml der dialysierten Enzym-Lösungen gestartet. Die Inkubation erfolgte unter ständiger Durchmischung in einem offenen (Sauerstoff-Zutritt) Wasserbad mit bewegter Bodenplatte lichtgeschützt bei 37°C über 90 Minuten. (Die Inkubationslösung enthielt absolut: 5,85 mg Natriumglykocholat, 400 μ g Eilecithin, 3 mg Glutathion, 3,66 mg Nikotinsäureamid, 380 μ g Magnesiumchlorid, 0,8-2 μ g 14 C- β -Carotin und 5-15 mg Protein in 2 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8). Daneben wurden Kontrollansätze mit 0 min Inkubationszeit sowie Kontrollexperimente ohne Protein durchgeführt. Alle Ansätze wurden als Doppelproben durchgeführt, aus denen später der Mittelwert errechnet wurde.

3.4.3 Extraktionsverfahren

Die enzymatische Reaktion wurde durch Zusatz von 2 ml Äthanol gestoppt. Anschließend erfolgte eine zweimalige Extraktion mit je 3 ml Petroläther, dem jeweils 2,5 mg Retinal und Retinol/100ml zugesetzt waren. Die vereinigten Extrakte wurden unter Stickstoff zur Trockne eingeeengt und der Rückstand in 200 µl 16 % (v/v) Dioxan in n-Hexan aufgenommen. Die Lösung wurde bis zur anschließenden HPLC-Analyse lichtgeschützt unter Stickstoff auf Eis gelagert.

Bei einem Teil der Proben wurde die so extrahierte Inkubationslösung zur Retinsäure-Analyse nochmals mit 3 ml Chloroform nachextrahiert. Der Extrakt wurde wiederum unter Stickstoff getrocknet und der Rückstand in 200 µl Methanol aufgenommen. Spätestens 90 Minuten danach erfolgte die Analyse mittels HPLC. Bis dahin wurden Die Proben wie beschrieben aufbewahrt. Die Extraktionsmittel enthielten als Antioxidans jeweils 0,005 % (w/v) BHT (Butylhydroxytoluol).

3.4.4 HPLC-Analysen

Die Auftrennung der Probenextrakte erfolgte in einem isokratisch gefahrenen System der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Pumpe (Modell 6000 A), Injektionsventil (U6K) und Detektor (UV/VIS, Modell 440) stammen von der Firma Waters Inc., Massachusetts, USA. Zur Aufzeichnung der Chromatogramme wurde ein Zweikanalschreiber verwendet (Modell PM 8288; Fa. Philipps, Niederlande).

β-Carotin, Retinal und Retinol wurden mit einer Lichrosorb SI-60 (5 µm)-Säule, 4,6 x 500 mm (Fa. Grom, Ammerbuch) getrennt. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus 16 %

(v/v) Dioxan in n-Hexan (B. WIRZ, 1987, persönliche Mitteilung). Die Flußrate betrug 1,8 ml/min. Die Absorptionsmessungen zur Peakerkennung wurden bei 436 nm für β -Carotin und bei 365 nm für Retinal und Retinol durchgeführt (Trennsystem 1).

Retinsäure wurde mit Hilfe einer Spherisorb ODS 1 (5 μ m)-Säule, 4,6 x 250 mm (Fa. Grom, Ammerbuch) isoliert. Die Elution erfolgte mit einem Gemisch aus 80 % Acetonitril und 20 % Wasser, das 1 % (w/v) Ammoniumacetat enthielt. Die Flußrate betrug 1,8 ml/min. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 365 nm (mod. nach Frolik et al., 1978) (Trennsystem 2).

3.4.5 Radioaktivitätsbestimmungen

Das extrahierte Probenmaterial wurde jeweils vollständig auf den HPLC aufgegeben. Die interessierenden Komponenten wurden nach der Trennung anhand der zugesetzten Standards bzw. ihrer spezifischen Retentionszeiten identifiziert und einzeln am Austritt aus dem Detektor aufgefangen. Anschließend wurden diese Proben mit Szintillatorflüssigkeit versetzt und zur Vermeidung von Fluoreszenz 24 Stunden im Dunkeln bei 4°C stehen gelassen. Dann erst wurde die Radioaktivität (Zerfälle pro Minute) in einem Flüssigszintillationszähler (Tri-Carb, Modell 4530; Packard Instr., Frankfurt) bestimmt.

Als Szintillatoren dienten je 15 ml Quickszint 501 (Toluol-Basis) für die in Dioxan/Hexan eluierten Proben sowie je 10 ml Quickszint 212 (Xylol-Basis; beide Zinsser Analytik GmbH, Frankfurt) für die in Acetonitril/Wasser gelösten Komponenten.

3.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von LOWRY et al. (1951) durchgeführt. Als Standard diente bovines Serumalbumin.

3.4.7 Berechnung der Enzymaktivität

Die jeweilige Umwandlungsrate wurde bestimmt als der prozentuale Anteil der Radioaktivität in den Vitamin-A-Fractionen (Retinal + Retinol) zur insgesamt pro Ansatz wiedergefundenen Aktivität (β -Carotin + Retinal + Retinol). Hiervon wurde der geringe, aber stets vorhandene Prozentsatz an Radioaktivität in den Vitamin-A-Fractionen aus den enzymfreien Kontrollansätzen abgezogen. Der so ermittelte Wert dividiert durch den für den jeweiligen Ansatz bestimmten Proteingehalt gibt die Umwandlungsrate in % pro mg Protein an.

3.5 Bestimmung verschiedener Vitamin-A-Formen in Follikelflüssigkeit und Serum

Die zur Retinsäure-, Retinal- und Retinol- Analyse bestimmte Follikelflüssigkeit wurde nach der Gewinnung zu gleichen Teilen mit Wasser, das 0,5 mg Vitamin C und 0,5 mg EDTA pro Milliliter enthielt, vermischt (ITO et al., 1974). Die Blutproben wurden während des Schlachtvorganges aufgefangen und nach vollständiger Gerinnung 20 min bei 1.200 g zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und weiter wie die Follikelflüssigkeit behandelt.

Die Extraktion der Vitamin-A-Metabolite erfolgte zu vergleichenden Zwecken parallel mit drei verschiedenen Verfahren:

- 1) Sofortige Extraktion der Proben (max. 90 Minuten nach der Schlachtung) in der unter 3.4.3 beschriebenen Weise mit Petroläther und Chloroform
- 2) Lyophilisation der Proben nach schnellstmöglichem Tiefgefrieren auf -40°C . Anschließend dreimalige Extraktion des Rückstandes mit Chloroform-Methanol (1:1 v/v) und Methanol in abwechselnder Reihenfolge (ITO et al., 1974)
- 3) Lyophilisation, danach dreimalige Extraktion mit n-Hexan und Methanol (HANSEN, 1986)

Sämtliche Extraktionsmittel enthielten als Antioxidans 0,005 % (w/v) BHT.

Die organischen Phasen wurden jeweils vereinigt und unter Stickstoff zur Trockne eingengt. Anschließend wurde der Rückstand in Methanol aufgenommen und über die HPLC analysiert. Abweichend von 3.4.4 erfolgte die Probenaufgabe durch einen Autosampler (MSI T-660; Kontron Instr., Eching) über eine 50 μl - Probenschleife. Als Integrator wurde das Modell C-R5 A (Shimadzu Corp., Japan) verwendet. Die 4,6 x 250 mm Trennsäule war gefüllt mit Spherisorb ODS 1 einer Teilchengröße von 5 μm (Grom, Ammerbuch). Als Elutionsmittel diente ein Gemisch aus 75 % Acetonitril und 25 % Wasser, das 1 % (v/v) Ammoniumacetat enthielt. Die Flußrate betrug 1,7 ml/min. Die Detektionswellenlänge für Retinsäure und Retinal betrug 365 nm, für Retinol 313 nm (Trennsystem 3).

Alle Arbeiten wurden, soweit möglich, lichtgeschützt und auf Eis durchgeführt.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die Follikelflüssigkeiten großer und kleiner Follikel gepoolt. Dieser Pool wurde mit einem Standardgemisch aus Retinsäure, Retinal und Retinol versetzt und portioniert. Mit jedem der drei Extraktionsverfahren wurden sechs dieser Proben analysiert. Nach Abzug der mit dem jeweils gleichen Verfahren ermittelten Retinol-Gehalte der ursprünglichen Follikelflüssigkeit wurde dann die Wiederfindung als der Quotient aus der ermittelten Menge zur zugesetzten Menge an Standardsubstanz, multipliziert mit 100, berechnet.

3.6 Bestimmung von Retinol, Retinylestern und Tocopherol in der Follikelflüssigkeit

Die gleichzeitige Analyse dieser drei Substanzen erfolgte in Anlehnung an die von DE LEENHEER et al. (1979) sowie von MILLER und YANG 1985) beschriebene Methode über HPLC. Die 4,0 x 125 mm Trennsäule war gefüllt mit Lichrosorb RP-18 einer Teilchengröße von 5 μ m (Fa. Grom, Ammerbuch). Die Elution erfolgte isokratisch mit reinem Methanol bei einer Flußrate von 1 ml/min (Trennsystem 4). Retinol und Retinylester wurden bei 313 nm über UV-Spektroskopie gemessen. Tocopherol wurde fluorimetrisch bestimmt (Exzitation 290 nm, Emission 330 nm; Fluoreszenzspektrophotometer F 1000, Fa. Merck, Darmstadt).

3.7 Hormonanalysen

Die Bestimmung der 17 β -Östradiol- und Progesteronkonzentration in der Follikelflüssigkeit erfolgten mit Hilfe der Methoden von MOSELEY et al. (1979) bzw. HOFFMANN et al. (1973).

3.8 Cholesterinbestimmung

Der Cholesteringehalt der Follikelflüssigkeit wurde nach der Methode von SIEDEL et al. (1981) enzymatisch mit einem entsprechenden Testkit der Firma Boehringer, Mannheim bestimmt.

3.9 Statistische Methoden

Die Meß- bzw. Rechenergebnisse sind als Einzelwerte sowie gruppenweise als Mittelwerte ($\bar{x}$) mit den dazugehörigen Standardabweichungen ($\pm s$) angegeben. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des Verfahrens nach Scheffe auf Signifikanz geprüft. Die Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Parametern wurden mittels der PEARSON'schen Korrelation berechnet (SACHS, 1978).

4 ERGEBNISSE

4.1 Methodik

4.1.1 Enzympräparation

Mit Hilfe der selektiven Eiweißfällung durch Präzipitation des Rohextraktes mit Ammoniumsulfat konnte die Proteinmenge bei der Präparation der Darmmukosa von Ratten um den Faktor 2,5 auf 40 % gesenkt und das Enzym entsprechend angereichert werden. Dies deckt sich mit Ergebnissen von GOODMAN und OLSON (1969). Bei der Präparation von Kaninchendärmen und Granulosazellen lagen die Anreicherungsfaktoren bei 3,1 bzw. 3,4. Damit sank die Proteinmenge auf 32 und 29%. Das Enzym-Ammoniumsulfat-Pellet konnte unter den beschriebenen Bedingungen bis zu drei Monaten ohne nennenswerten Aktivitätsverlust gelagert werden.

4.1.2 Inkubationsbedingungen

Durch Zusatz von Trypsininhibitoren zu den Ansätzen aus Darmmukosa ließen sich deutliche Erhöhungen der Carotinaseaktivitäten erzielen. Hierbei wurden mit TLCK um bis zu vierfach höhere Umwandlungsraten gegenüber Ansätzen mit Leupeptin, PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) oder Hühnerei-Inhibitoren erzielt.

Mit dem angewandten Verfahren war es möglich, β -Carotin für die enzymatische Umsetzung in reproduzierbaren, stabilen Emulsionen zu vermitteln. Die Größe der Emulsionströpfchen aus Eilecithin, Glykocholat und β -Carotin betrug dabei regelmäßig 4 - 7 μm . Die emulsionsbedingten

Varianzen in den Enzymaktivitäten zwischen den einzelnen Versuchen lagen hiermit unter 10 % .

Als Nullwerte wurden bei allen Versuchen zwei Ansätze ohne Enzymproteine mitinkubiert. Der dabei gemessene Anteil an Radioaktivität in der Vitamin-A-Fraktion unterschied sich nicht von dem, der für enzymhaltige Ansätze bei 0 min Inkubationszeit ermittelt wurde. Um das bei Arbeiten mit der Granulosa stets in relativ geringen Mengen zur Verfügung stehende Enzym vollständig für den eigentlichen Versuch zur Verfügung zu haben, wurde daher ersterem der Vorzug gegeben.

Als Sicherheit gegen unbeeinflussbare Schwankungen in den Inkubationsbedingungen, die an verschiedenen Versuchstagen zu etwas unterschiedlichen Umwandlungsraten gleicher Enzymansätze führten, wurden bei jedem Versuch zwei Kontrollansätze mitinkubiert. Diese enthielten gleichartige Enzympräparationen aus einem Pool der Darmmukosa von 12 Ratten. Alle Versuche wurden dann jeweils auf die Umwandlungsrate bei diesen Standards korrigiert.

4.1.3 Extraktionsverfahren

Mit dem für die Inkubationslösungen angewandten Extraktionsverfahren mit Petroläther wurden Wiederfindungsraten von 94 % für β -Carotin sowie von jeweils 100 % für Retinal und Retinol erreicht. Die Gesamtausbeute an Radioaktivität betrug für diese drei Fraktionen 84 - 90 % der eingesetzten Menge, was den Ergebnissen anderer Methoden gleichkommt (GOODMAN et al., 1967; B. WIRZ, persönliche Mitteilung). Von der bei einer doppelten Extraktion mit Petroläther und Chloroform wiedergefundenen Retinsäure

befanden sich 29 % in der Petroläther- und 71 % in der Chloroformphase.

Einen Überblick über die Wiederfindungsraten der drei Vitamin-A-Metabolite Retinal, Retinol, und Retinsäure bei Anwendung verschiedener Extraktionsverfahren aus Serum und Follikelflüssigkeit gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Wiederfindung von Vitamin-A-Metaboliten bei verschiedenen Extraktionsverfahren

Extraktionsverfahren	Retinsäure	Retinol	Retinal
Petroläther und Chloroform	93 %	105 %	101 %
Chloroform/Methanol und Methanol nach Lyophilisation	111 %	100 %	52 %
Hexan und Methanol nach Lyophilisation	103 %	96 %	64 %

4.1.4 HPLC-Analysen

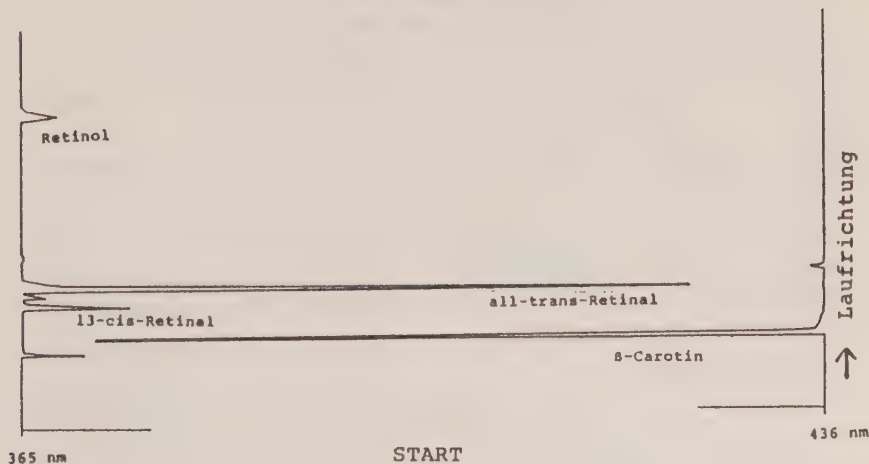
Mit dem System 1 konnten β -Carotin, Retinal und Retinol innerhalb von 17 Minuten vollständig getrennt werden. Unter den Versuchsbedingungen entstand aus all-trans-Retinal auch 13-cis-Retinal (begünstigtes Produkt der Photoisomerisation), weshalb die Radioaktivität aus cis- und trans-Fractionen zur Retinalbestimmung zusammen

addiert wurde. Die Retentionszeiten betrugen im Einzelnen:

β -Carotin	3,9 Minuten
13-cis-Retinal	6,2 "
all-trans-Retinal	7,2 "
Retinol	15,4 "

Ein typisches Chromatogramm des Enzymtests ist in Abbildung 8 dargestellt.

Abbildung 8: Chromatogramm der mit Trennsystem 1 eluierten Substanzen

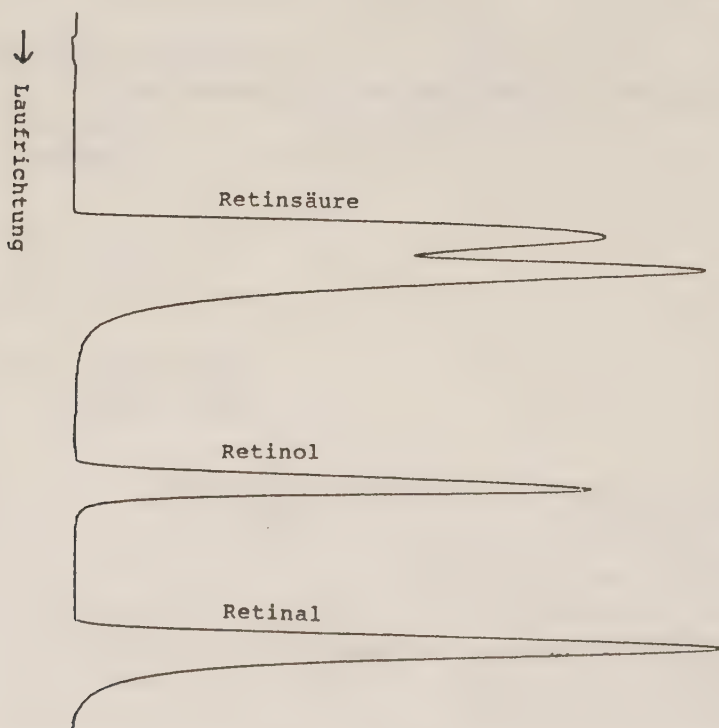


(Lichrosorb SI-60 (5 μ m), 4,6 x 500 mm; Eluent 16 % Dioxan in n-Hexan, 1,8 ml/min)

Mit Trennsystem 2 wurde Retinsäure nach 3,8 Minuten eluiert.

Trennsystem 3 ermöglichte die Analyse von Retinsäure (Retentionszeit: 6,4 und 6,7 min), Retinol (10,3 min) und Retinal (12,9 min) innerhalb von 14 Minuten. Abbildung 9 zeigt ein Standardchromatogramm dieser drei Vitamin-A-Metabolite.

Abb. 9: Standardchromatogramm für Retinsäure, Retinol und Retinal (Trennsystem 3)



(Spherisorb ODS 1 (5 μ m), 4,6 x 250 mm; Eluent 75 % Acetonitril : 25 % Wasser mit 1 % Ammoniumacetat, 1,7 ml/min)

Die Nachweisgrenze (Variationskoeffizient $< 5 \%$) bei diesem Verfahren lag für Retinsäure bei 5 ng und für Retinal bei 6 ng.

Die Retentionszeiten mit Trennsystem 4 lagen bei 2,1 min für Retinol, 5,4 min für Tocopherol, 13,8 min für Retinylpalmitat sowie 18,7 min für Retinylstearat. Die Nachweisgrenze für die Retinylester lag bei diesem Verfahren bei 3 ng.

4.2 Untersuchungen zur Carotinaseaktivität

Es wurden Enzympräparationen aus den Granulosazellen kleiner (K) und großer Follikel (G) vergleichend untersucht. Bei den großen Follikeln wurde darüberhinaus zwischen solchen von Tieren im Zyklusstadium IV (GG) und solchen von Tieren in unbekannten Stadien (GU) differenziert. Eine enzymatische Umwandlung von β -Carotin zu Vitamin A konnte in allen Ansätzen aus Granulosazellen großer Follikel demonstriert werden. Dagegen war in drei von neun Versuchen mit Enzympräparationen aus Zellen kleiner Follikel keine Vitamin-A-Bildung nachweisbar. Die durchschnittlichen Umwandlungsraten ($\%$ Vitamin A pro mg Protein; $\bar{x} \pm s$) betrugen $0,0027 \pm 0,0027$ für kleine Follikel, $0,0430 \pm 0,0167$ für große Follikel aus unbestimmten Zyklusstadien und $0,0779 \pm 0,0108$ für große Follikel, die im Zyklusstadium IV gewonnen worden waren (Abb. 11, S.62). Diese Werte sind für alle drei Gruppen hochsignifikant ($P < 0,001$) voneinander verschieden.

Als Hauptprodukt der enzymatischen Spaltung von β -Carotin wurde Retinal identifiziert. Der Anteil von Retinol am gesamten gebildeten Vitamin A lag bei allen Ansätzen aus Granulosazellen wie auch bei den Enzympräparationen aus Kaninchen- und Rattendarmmukosa zwischen 0 und 1,5 %.

Retinsäure konnte in keinem der untersuchten Inkubationsmedien nachgewiesen werden.

4.3 Konzentrationen von 17 β -Östradiol, Progesteron, Retinol, β -Carotin, Vitamin E und Cholesterin in der Follikelflüssigkeit

Die Einzelergebnisse dieser Bestimmungen aus den gepoolten Follikelflüssigkeiten der für die Enzympräparationen verwendeten Follikel sind in Tabelle 3 dargestellt. Tabelle 4 gibt Mittelwerte und Standardabweichungen für die jeweiligen Versuchsgruppen wieder. Aus dieser Tabelle wird ersichtlich, daß für die Konzentrationen an β -Carotin (0,9 - 1,5 $\mu\text{g/ml}$), Vitamin E (1,0 - 1,3 $\mu\text{g/ml}$) und Cholesterin (0,4 - 0,5 mg/ml) keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen bestanden. Dagegen weist der Quotient aus 17 β -Östradiol zu Progesteron für alle drei Versuchsgruppen hochsignifikant ($P < 0,001$) unterschiedliche Werte auf. Er lag in der Flüssigkeit großer Follikel um den Faktor 5 - 20 höher wie in der der kleinen. Die 17 β -Östradiol-Konzentration lag erwartungsgemäß in den großen Follikeln von Tieren im Zyklusstadium IV (GG) mit Werten von 101 bis 842 ng/ml deutlich über den in den kleinen Follikeln (15 - 74 ng/ml) und großen Follikeln unterschiedlicher Funktionszustände (74 - 319 ng/ml) gemessenen Konzentrationen. Umgekehrt fanden sich die höchsten Progesteronkonzentrationen in der Gruppe GU (bis 822 ng/ml), während die Gruppe GG mit durchschnittlich 60 ng/ml die niedrigsten Meßwerte enthielt. Die Retinolkonzentration lag in den großen Follikeln von Tieren im Zyklusstadium IV mit 244 ng/ml deutlich, aber nicht signifikant über den in Follikeln der anderen Gruppen gemessenen Werte von rund 200 ng/ml .

Tab. 3: Carotinaseaktivität, Steroide und Vitamine in den einzelnen Versuchsansätzen

Gruppe	No.	Umwandlungs- rate %/mg Protein x 10 ⁻²	Östradiol ng/ml	Progesteron ng/ml	Ö/P- Quotient	Retinol ng/ml	Carotin ng/ml	Vitamin E ng/ml	Cholesterin µg/ml
GG	1	8,8	158,4	61,4	2,58	261	649	725	426
	2	7,7	189,0	91,7	2,06	206	816	867	403
	3	8,5	305,0	53,9	5,66	199	1059	1015	587
	4	8,9	214,8	29,9	7,18	186	289	316	265
	5	6,3	668,0	87,4	7,64	318	1021	1458	523
	6	6,8	842,0	75,0	11,23	192	1625	1265	506
	7	7,8	753,0	58,6	12,85	317	1362	1319	587
	8	9,4	101,0	45,2	2,23	253	995	926	489
	9	6,6	525,6	42,7	12,31	242	1677	1290	454
	10	7,1	200,3	54,1	3,70	268	1078	1152	518
GU	1	5,0	117,0	395,0	0,30	206	1921	1600	414
	2	6,4	305,0	92,1	3,31	243	807	946	523
	3	4,9	319,2	165,4	1,93	235	1659	1430	696
	4	2,8	310,0	107,0	2,90	205	1913	1586	661
	5	2,4	73,6	822,0	0,09	113	1246	1113	311
K	1	0,0	14,8	66,2	0,22	219	567	658	362
	2	0,0	73,5	111,5	0,66	168	652	757	518
	3	0,0	18,6	140,1	0,13	200	464	697	339
	4	0,3	-,-	-,-	-,-	269	1131	1236	575
	5	0,3	33,2	167,0	0,20	178	1056	976	92
	6	0,1	18,8	82,5	0,23	199	1224	1237	460
	7	0,6	17,2	71,0	0,24	183	902	890	454
	8	0,4	29,7	76,7	0,39	174	1780	1468	500
	9	0,7	50,4	109,0	0,46	183	713	741	523

GG = Große Follikel von Tieren im Zyklusstadium IV

GU = Große Follikel von Tieren in unbestimmten Zyklusstadien

K = Kleine Follikel

Tabelle 4: Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Carotinase-aktivität ($\bar{x} \pm s$), nach Versuchsgruppen zusammengefaßt

	Große Follikel, Stadium IV (n = 10)	Große Follikel, unbest. Stadien (n = 5)	Kleine Follikel (n = 9)
Umwandlungs- rate in %/mg	7,79 $\pm$ 1,08 ^a	4,30 $\pm$ 1,67 ^b	0,27 $\pm$ 0,27 ^c
Protein $\times 10^{-2}$	(6,3 - 9,4)	(2,4 - 6,4)	(0,0 - 0,7)
17 β -Östradiol ng/ml	395,7 $\pm$ 275,5 ^a (101,0 - 842,0)	225,0 $\pm$ 119,5 ^b (73,6 - 319,2)	32,0 $\pm$ 7,2 ^c (14,8 - 73,5)
Progesteron ng/ml	60,0 $\pm$ 19,7 ^a (29,9 - 91,7)	316,3 $\pm$ 307,8 ^a (92,1 - 822,0)	103,0 $\pm$ 36,0 ^a (66,2 - 167,0)
Ö/P-Quotient	6,47 $\pm$ 4,21 ^a (2,06 - 12,85)	1,70 $\pm$ 1,47 ^b (0,09 - 3,31)	0,32 $\pm$ 0,17 ^c (0,13 - 0,66)
Retinol ng/ml	244,2 $\pm$ 48,6 ^a (186,0 - 318,0)	200,4 $\pm$ 51,7 ^a (113,0 - 243,0)	197,0 $\pm$ 31,2 ^a (168,0 - 269,0)
β -Carotin ng/ml	1057,1 $\pm$ 424,3 ^a (289,0 - 1677,0)	1509,2 $\pm$ 478,9 ^a (807,0 - 1921,0)	943,2 $\pm$ 408,9 ^a (464,0 - 1780,0)
Vitamin E ng/ml	1033,3 $\pm$ 340,7 ^a (316,0 - 1458,0)	1335,0 $\pm$ 292,8 ^a (946,0 - 1600,0)	962,2 $\pm$ 288,4 ^a (658,0 - 1468,0)
Cholesterin μ g/ml	475,8 $\pm$ 95,8 ^a (265,0 - 587,0)	521,0 $\pm$ 162,6 ^a (311,0 - 696,0)	424,8 $\pm$ 146,0 ^a (92,0 - 575,0)

Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile sind signifikant voneinander verschieden mit $P < 0,003$

Werte in Klammern stellen die Extremwerte dar

4.4 Vitamin-A-Formen in Follikelflüssigkeit und Serum

Mit den zur Verfügung stehenden analytischen Verfahren (Trennsysteme 3 und 4) konnten - unter Nutzung aller möglichen Konzentrierungsschritte bei der Extraktion - Retinsäure, Retinal und Retinylester bis zu Konzentrationen von 0,5 , 0,6 bzw. 1,5 ng/ml Probenflüssigkeit sicher bestimmt werden. Dennoch war in keiner der untersuchten Follikelflüssigkeitsproben der Nachweis eines dieser drei Vitamin-A-Metabolite möglich. Das gesamte bestimmbare Vitamin A lag hier in Form von Retinol vor.

Auch im Blutserum des Rindes konnten Retinsäure und Retinal nicht nachgewiesen werden.

4.5 Beziehungen von Carotinaseaktivität, Follikelgröße und verschiedener intrafollikulärer Parameter zueinander

Die Carotinaseaktivität in den Granulosazellen zeigte hochsignifikante, positive Korrelationen sowohl zur Größe wie auch zur Qualität (i.e. 17 β -Östradiol/Progesteron-Verhältnis) der verwendeten Follikel ($P < 0,001$). Weiterhin bestand eine gleichfalls positive Korrelation zur Retinolkonzentration in der Follikelflüssigkeit ($P < 0,001$). Dagegen ließ sich zwischen der Umwandlungsrate und den Konzentrationen an β -Carotin, Vitamin E oder Cholesterin keine Beziehung feststellen.

Die Retinolkonzentration war gleichfalls hochsignifikant positiv ($P < 0,001$) mit der Qualität der Follikel korreliert, während zur Progesteronkonzentration eine negative Korrelation bestand ($P < 0,001$). β -Carotin, Vitamin E und Cholesterin zeigten keine Abhängigkeit von diesen beiden

Parametern. Untereinander hingegen waren die Konzentrationen dieser drei Substanzen in jeder möglichen Kombination hochsignifikant positiv ($P < 0,001$) miteinander korreliert (Tabelle 5).

Tab. 5 Korrelationskoeffizienten zwischen Follikelgröße, -qualität, der erzielten Umwandlungsrate und der intrafollikulären Konzentration verschiedener lipophiler Substanzen

	Ö/P-Quotient (Qualität)	Umwandlungs- rate	17ß-Östradiol (Ö)	Progesteron (P)	Retinol	ß-Carotin	Vitamin E	Cholesterin
Follikel- größe	0,56***	0,88***	0,61***	0,12	0,34**	0,28	0,26	0,25
Ö/P-Quotient (Qualität)		0,62***	0,91***	-0,32	0,53***	0,22	0,20	0,26
Umwandlungs- rate			0,56***	-0,22	0,46***	0,02	-0,01	0,17
17ß-Östradiol (Ö)				-0,22	0,56***	0,36***	0,42***	0,42***
Progesteron (P)					-0,50***	0,22	0,19	-0,27
Retinol						0,03	0,25	0,42***
ß-Carotin							0,92***	0,41***
Vitamin E								0,50***

** P < 0,01
*** P < 0,001

5 DISKUSSION

5.1 Methodik

5.1.1 Enzympräparation

Die mit relativ geringem technischen Aufwand mögliche, selektive Ausfällung der Enzymproteine in Form eines Ammoniumsulfatpellets bringt gegenüber der direkten Verwendung des Rohextraktes drei wesentliche Vorteile mit sich:

- 1) Reduzierung der Proteinmenge in der Inkubationslösung durch Entfernung eines Teils der Nicht-Enzym-Proteine. Dies ist insofern bedeutsam, als die Extraktionsausbeute speziell für β -Carotin mit steigender Proteinmenge abnehmen kann und daher so gering wie möglich gehalten werden sollte. Bedingt sind diese erniedrigten Ausbeuten vermutlich durch Adsorption von β -Carotin an hydrophobe Regionen der gefällten Proteine (WIRZ, 1987, persönliche Mitteilung).
- 2) Anreicherung der isolierten Enzymmenge in einem kleinen Volumen. Dies ist besonders bei der Präparation der Granulosazellen von Nutzen, da es hierbei aus technischen Gründen zu einer Verdünnung des ohnehin nur in relativ geringen Mengen vorhandenen Enzyms in einem großen Flüssigkeitsvolumen kommt. Nach der Präzipitation des Enzyms als Ammoniumsulfatpellet ist es möglich, dieses konzentriert in den üblichen zwei Millilitern Inkubationsvolumen einzusetzen.
- 3) Möglichkeit zur Lagerung des Enzyms bei -20°C über mehrere Monate. OLSON & HAYAISHI (1965) beschreiben,

daß der Rohextrakt aus Rattenlebern ohne großen Aktivitätsverlust bei -20°C aufbewahrt werden kann. Dagegen zieht die Mehrzahl der anderen Autoren, soweit sie nicht den frischen Rohextrakt sofort inkubieren, eine Lagerung des Enzyms als Ammoniumsulfatpellet vor (FIDGE et al., 1969; GOODMAN & OLSON, 1969; LAKSHMANAN et al., 1972). Nachdem eigene Beobachtungen ebenfalls darauf hinwiesen, daß die Enzymaktivität im Pellet wesentlich zuverlässiger konserviert wird wie im gefrorenen Rohextrakt, wurden für die Untersuchungen alle Präparationen bis zu dieser Stufe durchgeführt. Durch diese Möglichkeit zur Lagerung des Enzyms können Präparation und Inkubation an verschiedenen Tagen durchgeführt werden, was arbeitstechnisch eine erhebliche Erleichterung darstellt.

5.1.2 Inkubationsbedingungen

Ein Hauptproblem bei der Erstellung des Enzymtests war die Vermittlung des Substrates β -Carotin. Als lipophile Substanz läßt sich dieses in einem wässrigen Inkubationsmedium nicht lösen, sondern muß als Emulsion eingebracht werden. Da sich die Carotinasereaktion nur an den Grenzflächen zwischen Emulsionströpfchen (β -Carotin) und umgebendem wässrigen Medium (Enzym) abspielen kann, muß die Reaktionsgeschwindigkeit von der Größe dieser Grenzflächen abhängig sein. Es wurde daher ein Verfahren entwickelt, das es erlaubt, kleinstmögliche Emulsionströpfchen mit hoher Reproduzierbarkeit herzustellen. In Anlehnung an die Untersuchungen von GOODMAN und OLSON (1969) wird bei praktisch allen nachfolgenden Carotinasearbeiten der Zusatz von Vitamin E als Antioxidans zum Inkubationsmedium beschrieben. In eigenen Versuchen führte dies grundsätzlich zu einem Brechen der Emulsionen. Dieser negative Effekt konnte weder durch Veränderungen im Zeit-

punkt der Zugabe noch durch Variation des Lösungsmittels, in dem das Vitamin E beigemischt wurde, verhindert werden. Die dadurch bedingte inhomogene Verteilung von β -Carotin verringerte die Umwandlungsrate und machte es darüberhinaus unmöglich, verschiedene Inkubationsansätze miteinander zu vergleichen. Infolgedessen verzichteten wir bei unseren Arbeiten gänzlich auf einen Vitamin-E-Zusatz. Nach GOODMAN und OLSON (1969) führt dies zwar zu einer geringeren Wiederfindung an Gesamtradioaktivität, beeinflusst jedoch die Umwandlungsrate selbst nicht. Diese lag mit 0,4 - 1,5 % Vitamin A pro mg Protein im oberen Bereich der von den meisten anderen Autoren für Darmansätze gefundenen Werte (vgl. Tab.1).

5.1.3 Analyse von Retinsäure, Retinol und Retinal

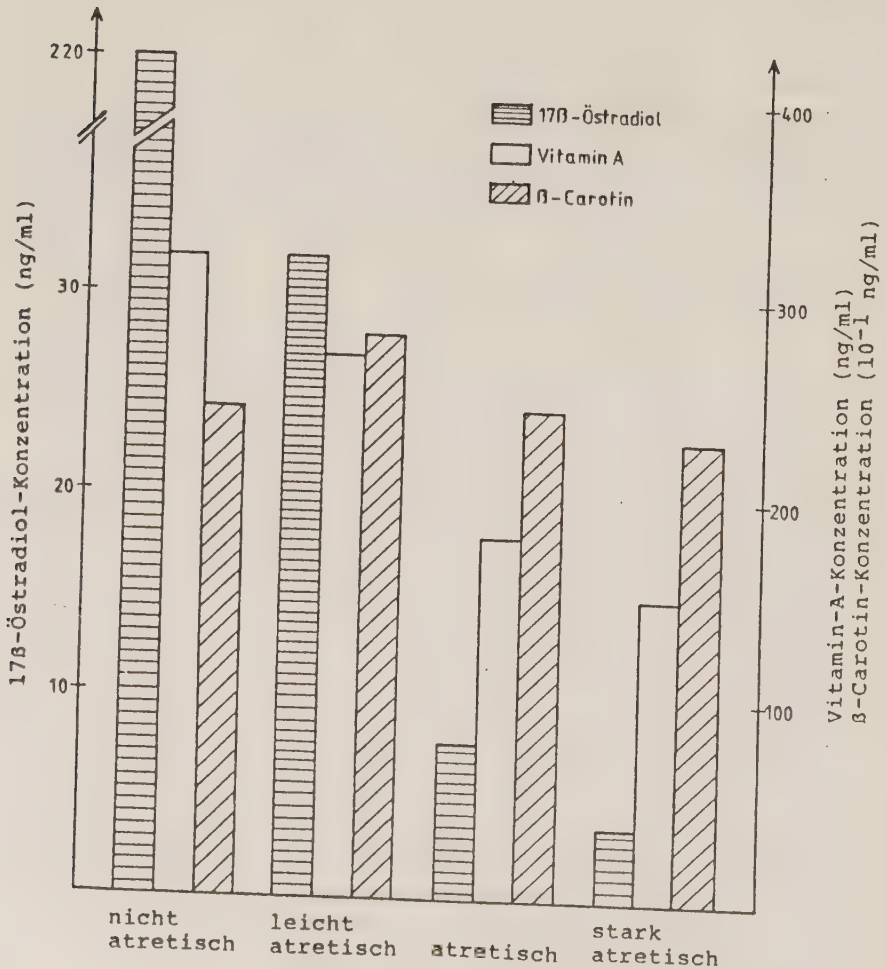
Die Extraktion dieser Vitamin-A-Metabolite erfolgte vergleichend mit drei verschiedenen Verfahren. Es zeigte sich dabei anhand der Wiederfindungsraten, daß das Lyophilisieren und anschließende Extrahieren der Proben nur für die Bestimmung der Retinsäure Vorteile gegenüber der sofortigen Extraktion des frischen Materials mit Petroläther und Chloroform bringt. Zur quantitativen Extraktion von Retinal hingegen sind diese Verfahren mit Wiederfindungsraten von 52 bzw. 64 % ungeeignet. Mit der von FROLIK et al. (1978) entwickelten und leicht modifizierten HPLC-Methode ist eine rasche und vollständige Trennung der drei Vitamin-A-Metabolite möglich. Die Quantifizierung über die photometrische Detektion erreicht eine Nachweisempfindlichkeit, die nahe der von radioaktiven Bestimmungen liegt. Die Spaltung des Retinsäure-Peaks im Trennsystem 3 (Abb. 9) ist vermutlich auf während der Extraktion stattfindende Isomerisierungen zurückzuführen. Die dabei hauptsächlich entstehende 13-cis-Retinsäure, die in einem ähnlichen HPLC-System ebenfalls kurz vor der

trans-Retinsäure eluiert wird (FROLIK et al., 1978), hat einen annähernd gleichen Extinktionskoeffizienten wie diese und dürfte damit die Bestimmung nur sehr geringfügig beeinflussen.

5.2 Vitamin-A-Stoffwechsel des ovariellen Rinderfollikels

SCHWEIGERT und ZUCKER (1988) konnten erstmals zeigen, daß zwischen der Vitamin-A-Konzentration in der Follikelflüssigkeit des Rindes und der Qualität der Follikel eine sehr deutliche Abhängigkeit besteht. Dies gilt jedoch nicht für β -Carotin, Vitamin E und Cholesterin (Abb. 10). Die in meiner Arbeit erhobenen Befunde bestätigen diese Ergebnisse. Es zeigt sich jedoch, daß zwischen den einzelnen Gruppen von Follikeln trotz hochsignifikanter Qualitätsunterschiede keine signifikanten Differenzen im Vitamin-A-Gehalt bestanden. Dies ist darauf zurückzuführen, daß im vorliegenden Fall gepoolte Flüssigkeiten aus jeweils 20 - 800 Follikeln analysiert wurden. Der Vitamin-A-Gehalt differiert zwischen guten bzw. stark atretischen Follikeln nur um den Faktor 2, wobei die Übergänge fließend sind. Die als Qualitätsmaßstab verwendete 17β -Östradiol-Konzentration dagegen weist zwischen stark atretischen, atretischen und leicht atretischen Follikeln gegenüber nicht atretischen Follikeln Unterschiede bis um den Faktor 50 auf. Dadurch können bereits einzelne, den entsprechenden Pools fehlerhaft zugeordnete Follikel zu einer gegenseitigen Angleichung der Vitamin-A-Werte zwischen einzelnen Gruppen führen, ohne daß sich dadurch auch die Unterschiede in den 17β -Östradiolkonzentrationen wesentlich verringern müssen. Die von SCHWEIGERT und ZUCKER (1988) vorgeschlagene Verwendung der Vitamin-A-Konzentration als Indikator für die Follikelqualität besitzt damit bezüglich gepoolter Follikelflüssigkeiten nur eine beschränkte Aussagekraft.

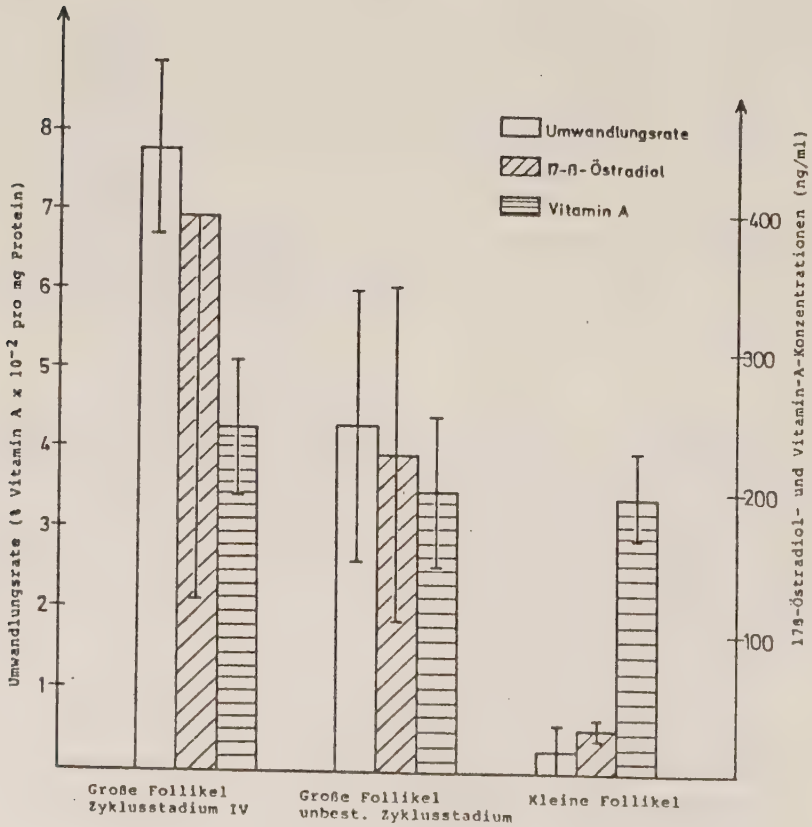
Abb. 10: Konzentration von 17 β -Östradiol, Vitamin A und β -Carotin in der Follikelflüssigkeit boviner Ovarialfollikel unterschiedlicher Qualität (nach SCHWEIGERT & ZUCKER, 1988)



Da Vitamin A im tierischen Organismus nicht de novo synthetisiert werden kann, vermuten SCHWEIGERT et al. (1986), daß eine lokale, enzymatische Spaltung von β -Carotin für den beobachteten Vitamin-A-Anstieg in Follikeln guter Qualität verantwortlich sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Nachweis einer hierfür notwendigen Carotinase in den Granulosazellen des Rindes erbracht. Darüberhinaus wurde gezeigt, daß die Aktivität dieses Enzyms sowohl mit wachsender Follikelgröße wie auch mit steigender Follikelqualität zunimmt. Dieser Aktivitätssteigerung entspricht eine Zunahme der Vitamin-A-Menge in größeren Follikeln (gleichbleibende Konzentration trotz Vervielfachung des Volumens) sowie insbesondere in Follikeln höherer Qualität (steigende Vitamin-A-Konzentration) (Abb. 11). Diese Parallelität läßt den Schluß zu, daß das Enzym Carotinase maßgeblich, wenn nicht ausschließlich für den Vitamin-A-Gehalt des ovariellen Rinderfollikels verantwortlich sein könnte.

Ein anderer Weg, die Vitamin-A-Menge im Follikel zu beeinflussen, läge in einem vermehrten Transfer dieses Vitamins aus dem Serum in die Follikelflüssigkeit. Dieser könnte zunächst in Form von RBP-TTR-gebundenem Retinol erfolgen. Dieser Komplex müßte nach den Untersuchungen von ANDERSEN et al. (1976) aufgrund seines geringen Molekulargewichtes (75.000) freien Zugang zur Follikelflüssigkeit haben, sofern die von SHALGI et al. (1973) aufgestellte Molekularsiebtheorie der Blut-Follikelflüssigkeits-Schranke uneingeschränkte Gültigkeit besäße. Dann jedoch müßte nach den Überlegungen von SCHWEIGERT (1986) die Vitamin-A-Konzentration in der Follikelflüssigkeit etwa 110 % der Serumkonzentration betragen, wogegen die tatsächlich gefundenen Werte zwischen 49 und 77 % liegen. Es existiert demnach ein Mechanismus, der den Retinol-RBP-TTR-Komplex - zumindest teilweise - vom Transfer in die

Abb. 11: Beziehungen zwischen der Carotinaseaktivität und den Konzentrationen von 17 β -Östradiol und Vitamin A in der Follikelflüssigkeit der drei untersuchten Follikelgruppen



Follikelflüssigkeit ausschließt. Um auch den Anstieg der Vitamin-A-Konzentration in Follikeln guter Qualität über diesen Mechanismus erklären zu können, müßte weiterhin gefordert werden, daß er in seiner Aktivität von der Follikelqualität abhängig ist. Dies wäre insofern einzigartig, als andere Proteine mit einem vergleichbaren Molekulargewicht in ihrer Konzentration von der Follikelgröße unabhängig sind (ANDERSEN et al., 1976). Es erscheint daher unwahrscheinlich, daß der Vitamin-A-Gehalt der Follikelflüssigkeit über diesen Weg gesteuert wird. Um jedoch den Transfer von RBP-TTR-gebundenem Retinol in die Follikelflüssigkeit sicher ausschließen oder anderenfalls den Umfang eines solchen Transfers bestimmen zu können, müßte eine immunologische Untersuchung der Follikelflüssigkeit auf dieses Transportprotein erfolgen. Hierzu stehen jedoch derzeit noch keine geeigneten Verfahren für das Rind zur Verfügung.

Eine weitere Möglichkeit, wie Vitamin A aus dem Serum in die Follikelflüssigkeit gelangen könnte, wäre in Form seines Metaboliten Retinsäure. Diese wird nach experimenteller Applikation im Serum an Albumin gebunden transportiert (OTT & LACHANCE, 1979). Da Albumin freien Zugang zur Follikelflüssigkeit hat (ANDERSEN et al., 1976; SHALGI et al., 1973), wäre auf diesem Weg ein Transfer der Retinsäure in den Follikel denkbar. In den diesbezüglichen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, daß Retinsäure - ebenso wie Retinal - weder im Serum noch in der Follikelflüssigkeit des Rindes in meßbaren Mengen vorliegt. Damit scheint auch dieser Mechanismus zur Beeinflussung des follikulären Vitamin-A-Gehaltes nicht beitragen zu können.

Letztlich wäre noch ein Transfer des vierten Vitamin-A-Metaboliten, der Retinylester, zu erwägen. Aufgrund der Physiologie der enteralen Vitamin-A-Resorption kommen

Retinylester im Serum praktisch nur in Bindung an die Lipoproteinfraktionen VLDL und LDL vor (SCHWEIGERT, 1987, persönliche Mitteilung). Nach übereinstimmenden Angaben von PERRET et al. (1985) und SCHWEIGERT et al. (1987) können dagegen in der Follikelflüssigkeit nur Lipoproteine der Klasse HDL nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Hypothese von SHALGI et al. (1973), wonach Moleküle mit einem Molekulargewicht über 850.000 grundsätzlich von einem Transfer in die Follikelflüssigkeit ausgeschlossen sind. Die Konzentration lipophiler, an HDL gebundener Substanzen in der Follikelflüssigkeit zeigt, soweit bisher untersucht, keine Abhängigkeit von der Größe oder Qualität der Follikel. Diese Beobachtung von SCHWEIGERT und ZUCKER (1988) wird durch die eigenen Ergebnisse für β -Carotin, Vitamin E und Cholesterin bestätigt. Daraus läßt sich ableiten, daß das Vitamin A, falls es wider Erwarten doch in Form seiner Ester als Lipoproteinkomplex in die Follikelflüssigkeit gelangen könnte, auf diesem Weg keine Möglichkeit einer größen- bzw. qualitätsabhängigen Steuerung seiner Transferrate hätte. Tatsächlich finden CHEW et al. (1984) bei ihren Untersuchungen, daß in der gepoolten Follikelflüssigkeit von Rindern 33 % der Vitamin-A-Menge in Form von Retinylestern vorliegt. Die bei dieser Arbeit angewandte Methode (Säulenchromatographie über Aluminiumoxid) erlaubt jedoch keine Trennung von β -Carotin und Retinylestern. Diese beiden Substanzen wurden daher gemeinsam bei verschiedenen Wellenlängen im Photometer gemessen und über die Extinktionskoeffizienten quantifiziert. Der Tatsache, daß β -Carotin bei beiden Wellenlängen absorbiert, wurde in Form einer mathematischen Korrektur des dadurch überhöhten Meßwertes für Retinylester Rechnung getragen. Um die mit diesem relativ unsicheren Verfahren gewonnenen Werte zu überprüfen, untersuchten wir Proben aus Follikeln unterschiedlicher Größe und Qualität mit einem sehr präzisen und empfindlichen Verfahren der Hochleistungsflüssigkeitschromato-

graphie. Hierbei zeigte sich, daß in keiner der untersuchten Proben Retinylester vorhanden waren. Dieser Befund wurde durch eine Verseifung des Probenmaterials und anschließende erneute Analyse bestätigt. Diesem offensichtlichen Widerspruch zu den Ergebnissen von CHEW et al. (1984) liegt deshalb wohl eine Fehlinterpretation der von diesen Autoren erhobenen Befunde zugrunde.

Zusammenfassend kann damit festgestellt werden, daß für einen Transfer von Vitamin A aus dem Serum in die Follikelflüssigkeit keine Anhaltspunkte vorliegen. Vitamin A zeigt vielmehr mit seinen qualitätsabhängigen Konzentrationsänderungen in den Follikeln ein Verhalten, das sonst nur von Produkten follikulärer Zellen, den Steroidhormonen, bekannt ist. In Verbindung mit dem Nachweis einer größen- und qualitätsabhängigen Carotinaseaktivität in den Granulosazellen wird hieraus gefolgert, daß dieses Enzym für die Steuerung des Vitamin-A-Stoffwechsels im ovariellen Rinderfollikel verantwortlich ist.

Die empfindliche Regulation des Vitamin-A-Spiegels in der Follikelflüssigkeit läßt vermuten, daß hiermit entsprechenden Erfordernissen von Seiten des Follikels Rechnung getragen wird. Da jeweils nur ein Follikel, der vermutlich später zur Ovulation gelangen wird, über eine deutlich höhere Vitamin-A-Konzentration verfügt wie alle anderen (SCHWEIGERT et al., 1986), kommt diesem Vitamin möglicherweise bei der Entwicklung und Reifung dieser dominanten Follikel eine besondere Rolle zu. Hierzu wären die folgenden drei Angriffsmechanismen - auch nebeneinander - denkbar:

- 1) Direkter Einfluß auf die Reifung der Oozyte
- 2) Funktion bei der Synthese der Steroidhormone

3) Regulation der zur Ovulation führenden Faktoren

In vivo gereifte Schafoozyten weisen im zeitlichen Verlauf deutliche Veränderungen im Synthesemuster ihrer Proteine auf, während bei extrafollikulär gereiften Oozyten das Ausgangsmuster nahezu unverändert erhalten bleibt (MOOR & WARNES, 1978). Die mangelhafte Weiterentwicklung von in vitro gereiften und fertilisierten Eizellen wird mit dieser ungenügenden Zytoplasmareifung begründet (CRAN & MOOR, 1980). Einer der diskutierten Wirkmechanismen von Vitamin A besteht nun in einer steroidähnlichen Beeinflussung der m-RNA- und damit letztlich der Proteinsynthese einer Zelle (WOLF, 1984). Es ist daher vorstellbar, daß eine Änderung der Vitamin-A-Konzentration im physiologischen Nährmedium der Oozyte, der Follikelflüssigkeit, Einfluß auf diese finalen Reifungsvorgänge hat oder sogar unmittelbar für sie verantwortlich ist.

Über den gleichen Mechanismus wäre eine Beteiligung an der Synthese der Steroidhormone denkbar. Da diese von den Zellen der Follikelwand synthetisiert werden (MOOR, 1977), könnte die Bildung der hierfür notwendigen Enzyme durch den follikulären Vitamin-A-Gehalt reguliert sein. Unterstützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen, nach denen es bei Ratten beiderlei Geschlechts im Vitamin-A-Mangel zu erheblichen Beeinträchtigungen der Steroidhormonsynthese kommt (JUNEJA et al., 1966; GANGULY et al., 1971; JAYARAM et al., 1973). Aufgrund der nachgewiesenen Carotinaseaktivität lassen sich gleichartige Störungen bei Rindern im β -Carotinmangel möglicherweise direkt als Folge einer lokalen Vitamin-A-Unterversorgung der follikulären Zellen erklären (JACKSON et al., 1981; BINDAS et al., 1984; MEINECKE et al., 1986).

Der genaue Ablauf der zur Ovulation führenden Vorgänge ist bislang nicht geklärt. Es wird jedoch angenommen, daß

proteolytischen Enzymen, vor allem Kollagenasen, hierbei eine wesentliche Rolle zukommt. Daneben soll eine durch Prostaglandine unterhaltene, entzündliche Reaktion im perifollikulären Gewebe zu dessen Lockerung und Auflösung beitragen (ESPEY, 1978). Vom Vitamin A ist bekannt, daß es an der Kontrolle der Expression verschiedener Enzyme, darunter der beiden Proteasen Kollagenase und dem Plasminogen-Aktivator, beteiligt ist. Daneben wird ein Einfluß auf die Prostaglandinsynthese diskutiert (ROBERTS & SPORN, 1984). Die von SCHAMS et al. (1977) beschriebenen verzögerten Ovulationen von Rindern im β -Carotinmangel könnten daher ebenfalls auf einen dadurch hervorgerufenen lokalen Vitamin-A-Mangel im Follikel zurückzuführen sein.

5.3 Schlußfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Carotinase in den Granulosazellen des Rindes nachgewiesen, deren Aktivität von der Größe und der Qualität der untersuchten Follikel abhängig war. Daneben konnte gezeigt werden, daß für einen größen- oder qualitätsabhängigen Transfer einzelner Vitamin-A-Metabolite aus dem Serum in die Follikelflüssigkeit keine Anhaltspunkte bestehen. Gegen einen derartigen Transfer spricht auch die Tatsache, daß bei den sogenannten "white-fat-animals", die zur enteralen Carotinoidsorption nicht oder nur in sehr beschränktem Umfang fähig sind, keine Unterschiede im Vitamin-A-Gehalt von Follikeln unterschiedlicher Qualität beobachtet werden können (F. J. SCHWEIGERT, 1987, persönliche Mitteilung). Aus diesen Erkenntnissen heraus kann gefolgert werden, daß der erstmals von SCHWEIGERT et al. (1986) beim Rind beobachtete Vitamin-A-Anstieg in der Follikelflüssigkeit der zur Ovulation bestimmten Follikel auf eine enzymatische Spaltung von β -Carotin in den Granulosazellen zurückzuführen ist. Die gezielte, lokale Steuerung dieses Vorgangs wird

als empfindlicher Mechanismus zur Regulation der Reifung und Entwicklung des dominanten Follikels betrachtet, wobei verschiedene Ansatzpunkte auf molekularer Ebene diskutiert werden können.

Ein Teil der in klinischen Untersuchungen festgestellten, eigenständigen Wirkungen von β -Carotin im Fruchtbarkeitsgeschehen des Rindes kann damit offensichtlich auf eine lokale, essentielle Provitamin-A-Funktion zurückgeführt werden. Es besäße somit als unverzichtbares Substrat für die lokale follikuläre Retinolbildung selbst den Charakter eines Vitamins. Für optimale reproduktive Leistungen beim Rind ist damit neben zahlreichen anderen Faktoren eine ausreichende Versorgung mit β -Carotin als notwendig zu betrachten.

Durch Inkubationsversuche von Enzympräparationen mit ^{14}C -markiertem β -Carotin und anschließender HPLC-Analyse der Spaltprodukte konnte eine Carotinaseaktivität in den Granulosazellen boviner Ovarialfollikel nachgewiesen werden. Es zeigte sich, daß diese Enzymaktivität sowohl von der Größe wie auch von der Qualität der untersuchten Follikel abhängig war, wobei die höchsten Umwandlungsraten mit Enzympräparationen aus Granulosazellen großer, präovulatorischer Follikel erzielt wurden.

Der Vitamin-A-Gehalt in der Follikelflüssigkeit war hochsignifikant mit der erzielten Umwandlungsrate sowie mit der Qualität der Follikel korreliert, während sich für β -Carotin, Tocopherol und Cholesterin keine derartigen Abhängigkeiten zeigten.

Retinsäure und Retinal konnten weder im Serum noch in der Follikelflüssigkeit des Rindes nachgewiesen werden. In letzterer fanden sich darüberhinaus auch keine Retinylester. Vitamin A liegt damit in der Follikelflüssigkeit des Rindes ausschließlich in Form von Retinol vor.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß die Erhöhung des Vitamin-A-Gehaltes in der Follikelflüssigkeit großer, nicht atretischer Follikel durch die lokale Spaltung von β -Carotin in den Granulosazellen bedingt ist, während ein qualitätsabhängiger Transfer von Vitamin A aus dem Serum sehr unwahrscheinlich erscheint. Dieser Mechanismus würde eine empfindliche Steuerung des Vitamin-A-Gehaltes jedes einzelnen Follikels erlauben, dem seinerseits eine Bedeutung bei der Entwicklung und Reifung der follikulären Strukturen beigemessen wird.

SUMMARY

CAROTENE CLEAVAGE ACTIVITY IN BOVINE GRANULOSA CELLS

Carotene cleavage activity has been demonstrated in bovine ovarian follicles by incubating enzyme preparations from granulosa cells with ^{14}C - β -carotene. Reaction products were analysed by HPLC. Enzyme activity appeared to be highly dependent on both size and quality of follicles. Highest conversion rates were obtained with enzyme preparations from granulosa cells of large, preovulatory follicles.

The correlation between follicular fluid concentrations of vitamin A and the conversion rates obtained with the corresponding enzyme preparations was highly significantly positive. The same was found to be true for vitamin A content and follicular quality. No such correlations, however, could be shown for conversion rates and follicle quality with β -carotene, tocopherol and cholesterol.

Neither retinoic acid, retinal nor retinyl esters could be detected in follicular fluid. Thus the only vitamin A metabolite in follicular fluid of cattle appears to be retinol.

Based on these observations, it seems likely that the rise in concentration of retinol with follicular quality is due to the local cleavage of β -carotene by the enzyme carotenase in granulosa cells, rather than to an enhanced transfer of this vitamin from serum. This would offer a mechanism for a sensitive regulation of the vitamin A content of individual follicles, which could be of importance for development and maturation of follicular structures.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ahlswede, L. & H. Konerman (1980)
Erfahrungen mit der oralen und parenteralen
Applikation von β -Carotin beim Pferd.
Prakt. Tierarzt **61**, 47-52
- Ahlswede, L. & K.-H. Lotthammer (1978)
Untersuchungen über eine spezifische, Vitamin-A-
unabhängige Wirkung des β -Carotins auf die Fertilität
des Rindes. 5. Mitteilung: Organuntersuchungen -
Gewichts- und Gehaltsbestimmungen.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **85**, 7-12
- Akordor, F.Y., J.B. Stone, J.S. Walton, K.E. Leslie & J.G.
Buchanan-Smith (1986)
Reproductive performance of lactating Holstein cows
fed supplemental β -carotene.
J. Dairy Sci. **69**, 2173-2178
- Andersen, M.M., J. Kroll, A.G. Byskov & M. Faber (1976)
Protein composition in the fluid of individual bovine
follicles.
J. Reprod. Fert. **48**, 109-118
- Arbeiter, K., E. Knaus & M. Thurnher (1983)
Repetitionstest über die Genitalfunktion von Rindern
in Abhängigkeit vom β -Carotingehalt im Blut.
Zbl. Vet. Med. A. **30**, 206-213
- Arbeiter, K. & D. Lorin (1986)
Der Einfluß von β -Carotin auf die Fruchtbarkeit von
Stuten.
VET **1**, 22-27
- Ascarelli, I., Z. Edelman, M. Rosenberg & Y. Folman (1985)
Effect of dietary carotene on fertility of high
yielding dairy cows.
Anim. Prod. **40**, 195-207
- Bieri, J.G. & C.J. Pollard (1954)
Studies of the site of conversion of β -carotene
injected intravenously into rats.
Br. J. Nutr. **8**, 32-44
- Bindas, E.M., F.C. Gwazdauskas, R.J. Aiello, J.H. Herbein,
M.L. McGilliard & C.E. Polan (1984)
Reproductive and metabolic characteristics of dairy
cattle supplemented with β -carotene.
J. Dairy Sci. **67**, 1249-1255

- Bonsembiante, M., I. Andrighetto & G. Bittante (1983a)
Beta-carotene e fertilità bovina. Ulteriori risultati sperimentali.
Zootec. Nutr. Anim. 9, 199-212
- Bonsembiante, M., I. Andrighetto & G. Bittante (1983b)
Effetto del beta-carotene sulla gravidanza e sul parto di manze da carne e sull'allevamento dei vitelli ottenuti in confinamento.
Zootec. Nutr. Anim. 9, 401-417
- Bonsembiante, M., G. Bittante & I. Andrighetto (1980)
(The effect of β -carotene on the fertility of cows fed diets supplemented with vitamin A).
Zootec. Nutr. Anim. 6, 47-58
- Brüggemann, J. & K.-H. Niesar (1956)
Über die Beziehungen der Vitamine A und E und des β -Karotins zum weiblichen Sexualzyklus des Rindes und Schweines unter besonderer Berücksichtigung der Zyklussterilität.
Vitam. Horm. 7, 10-25
- Burton, G.W. & K.U. Ingold (1984)
 β -Carotene: An unusual type of lipid antioxidant.
Science 224, 569-573
- Caravaglios, R. & R. Cilotti (1957)
A study of the proteins in the follicular fluid of the cow.
J. Endocrinol. 15, 273-278
- Cerletti, P. & L. Zichella (1961)
Nucleotidases, nucleotides, vitamins and coenzymes in the follicular fluid of human ovary.
Clin. Chim. Acta 6, 581-582
- Channing, C.P. & F. Ledwitz-Rigby (1974)
Methods for assessing hormone-mediated differentiation of ovarian cells in culture and in short-term incubations.
Methods Enzymol. 39, 183-230
- Chew, B.P. & R.G. Archer (1983)
Comparative role of vitamin A and β -carotene on reproduction and neonate survival in rats.
Theriogenology 20, 459-472
- Chew, B.P., D.M. Holpuch & J.V. O'Fallon (1984)
Vitamin A and β -Carotene in bovine and porcine plasma, liver, corpora lutea, and follicular fluid.
J. Dairy Sci. 67, 1316-1322
- Chytil, F. & D.E. Ong (1979)
Cellular retinol- and retinoic acid-binding proteins in vitamin A action.
Fed. Proc. 38, 2510-2514

- Cran, D.G. & R.M. Moor (1980)
The development of oocytes and ovarian follicles of mammals.
Sci. Prog. 66, 371-383
- David, A., G. Frenkel, P.F. Kraicer & A. Weinstein (1973)
Chemical composition of rabbit follicular fluid.
Fert. Steril. 24, 227-229
- De Leenheer, A.P., V.O.R.C. De Bevere, M.G.M. De Ruyter & A.E. Claeys (1979)
Simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in human serum by high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr. 162, 408-413
- De Luca, H.F. (1979)
Retinoic acid metabolism.
Fed. Proc. 38, 2519-2523
- Desjardins, C., K.T. Kirton & H.D. Hafs (1966)
Some chemical, immunochemical and electrophoretic properties of bovine follicular fluid.
J. Reprod. Fert. 11, 237-244
- Dieleman, S.J., T.A.M. Kruip, P. Fontijne, W.H.R. deJong & G.C. van der Weyden (1983)
Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone.
J. Endocrinol. 97, 31-42
- Ducker, M.J., N.H. Yarrow, G.A. Bloomfield & J.D. Edwards-Webb (1984)
The effect of β -carotene on the fertility of dairy heifers receiving maize silage.
Anim. Prod. 39, 9-16
- Edwards, R.G. (1974)
Follicular fluid.
J. Reprod. Fert. 37, 189-219
- Eitzer, P. & H.J. Rapp (1985)
Zur oralen Anwendung von synthetischem β -Carotin bei Zuchtstuten.
Prakt. Tierarzt 66, 123-127
- Epstein, J.H. (1977)
Effects of β -carotene on ultraviolet induced cancer formation in the hairless mouse skin.
Photochem. Photobiol. 25, 211-213

- Erickson, G.F. & A.J. Hsueh (1978)
Stimulation of aromatase activity by follicle
stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo
and in vitro.
Endocrinology 102, 1275-1282
- Espey, L.L. (1978)
Ovulation. In: The Vertebrate Ovary. Jones, R.E. (ed)
Plenum Press, New York, pp. 503-532
- Fidge, N.H. & D.S. Goodman (1968)
The enzymatic reduction of retinal to retinol in rat
intestine.
J. Biol. Chem. 243, 4372-4379
- Fidge, N.H., F.R. Smith & D.S. Goodman (1969)
The enzymatic conversion of β -carotene into retinal
in hog intestinal mukosa.
Biochem. J. 114, 689-694
- Fiedler, E. (1984)
Beta-Carotin- und Vitamin E-Zulage an abgesetzte
Sauen.
Landesanstalt für Schweinezucht, Forchheim, 82-85
- Folman, Y., I. Ascarelli, Z. Herz, M. Rosenberg, M.
Davidson & A. Halevi (1979)
Fertility of dairy heifers given a commercial diet
free of β -carotene.
Br. J. Nutr. 41, 353-359
- Frolik, C.A., T.E. Tavela & M.B. Sporn (1978)
Separation of the natural retinoids by high-pressure
liquid chromatography.
J. Lipid Res. 19, 32-37
- Ganguly, J. & S.K. Murthy (1967)
Biogenesis of vitamin A and carotenoids.
In: The Vitamins.
Academic Press, New York, pp. 125-153
- Ganguly, J., G.S. Pope, S.Y. Thompson, J. Toothill, J.D.
Edwards-Webb & H.B. Waynforth (1971)
Studies on metabolism of vitamin A. The effect of
vitamin A status on the secretion rates of some
steroids into the ovarian venous blood of pregnant
rats.
Biochem. J. 122, 235-239
- Ganguly, J. & P.S. Sastry (1985)
Mechanism of conversion of β -carotene into vitamin A
- central cleavage versus random cleavage.
Wld. Rev. Nutr. Diet. 45, 198-220

- Gawienowski, A.M., M. Stacewicz-Sapuncakis & R. Longley (1974)
Biosynthesis of retinal in bovine corpus luteum.
J. Lipid Res. **15**, 375-379
- Gershoff, S.N., S.B. Andrus, D.M. Hegsted & E.A. Lentini (1957)
Vitamin A deficiency in cats.
Lab. Invest. **6**, 227-240
- Glover, J. & E.R. Redfearn (1954)
The mechanism of the transformation of β -carotene into vitamin A in vivo.
Biochem. J. **58**, XV-XVI
- Goodman, D.S., R. Blomstrand, B. Werner, H.S. Huang & T. Shiratori (1966a)
The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and β -carotene in man.
J. Clin. Invest. **45**, 1615-1623
- Goodman, D.S. & H.S. Huang (1965)
Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzymes.
Science **149**, 879-880
- Goodman, D.S., H.S. Huang, M. Kanai & T. Shiratory (1967)
The enzymatic conversion of all-trans β -carotene into retinal.
J. Biol. Chem. **242**, 3543-3554
- Goodman, D.S., H.S. Huang & T. Shiratori (1966b)
Mechanism of the biosynthesis of vitamin A from β -carotene.
J. Biol. Chem. **241**, 1929-1932
- Goodman, D.S. & J.A. Olson (1969)
The conversion of all-trans β -carotene into retinal.
Methods Enzymol. **15**, 462-475
- Goswami, B.C. & G. Britton (1987)
Mechanisms of the conversion of β -carotene into vitamin A.
8th Int. Symposium on Carotenoids, Boston.
- Greenberg, R., T. Cornbleet & R. Demovsky (1957)
Conversion of carotene to vitamin A by sebaceous glands.
Arch. Dermat. **76**, 17-23
- Gronowska-Senger, A. & G. Wolf (1969)
Effect of dietary protein on the enzyme from rat and human intestine which converts β -carotene to retinal.
J. Nutr. **100**, 300-308

- Gross, J. & P. Budowski (1966)
Conversion of carotenoids into vitamins A1 and A2 in
two species of freshwater fish.
Biochem. J. 101, 747-754
- Guraya, S.S. (1985)
Biology of ovarian follicles in mammals.
Springer, Berlin.
- Hansen, S. (1986)
Enzymatische Primärschritte im Vitamin A-
Stoffwechsel.
Diss. rer. nat., Saarbrücken
- Hasani, S.M. & D.B. Parrish (1972)
Forms of vitamin A and of carotenoids in tissues,
blood serum and yolk of eggs from coturnix coturnix
japonica fed β -apo-carotenals.
J. Nutr. 102, 1437-1440
- Heap, R.B., A. Henville & J.L. Linzell (1975)
Metabolic clearance rate, production rate, and
mammary uptake and metabolism of progesterone in
cows.
J. Endocrinol. 66, 239-247
- Heinz, E. & A. Herzog (1982)
Erste Praxiserfahrungen mit dem Einsatz eines
synthetischen β -Carotins im Rahmen der
zuchthygienisch-prophylaktischen Betreuung von
Milchkuhherden.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 95, 214-217
- Henderson, K.M., A.S. McNeilly & I.A. Swanston (1982)
Gonadotrophin and steroid concentrations in bovine
follicular fluid and their relationship to follicle
size.
J. Reprod. Fert. 65, 467-473
- Heywood, R., A.K. Palmer, R.L. Gregson & H. Hummler (1985)
The toxicity of beta-carotene.
Toxicology 36, 91-100
- Hoffmann, B., H.J. Kyrein & M.L. Ender (1973)
An efficient procedure for the determination of
progesterone by radioimmunoassay applied to bovine
peripheral plasma.
Horm. Res. 4, 302-310
- Hollander, D. (1981)
Intestinal absorption of vitamins A, E, D and K.
J. Lab. Clin. Med. 97, 449-462

- Holst, W., E.J. Tjalsma & C.I. Wonder (1984)
Experiences with oral administration of β -carotene to pony mares in early spring.
35th annual meeting of the European Association for animal production. The Hague-The Netherlands.
- Ireland, J.J., R.L. Murphee & P.B. Coulson (1980)
Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum.
J. Dairy Sci. **63**, 155-160
- Ireland, J.J. & J.F. Roche (1983)
Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins of follicles.
J. Anim. Sci. **57**, 157-167
- Ireland, J.J. & J.F. Roche (1987)
Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. In: Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals.
Roche, J.F. & D. O'Callaghan (eds),
Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 1-18
- Ito, Y.L., M. Zile, H. Ahrens & H.F. DeLuca (1974)
Liquid-gel partition chromatography of vitamin A compounds; formation of retinoic acid from retinyl acetate in vivo.
J. Lipid Res. **15**, 517-524
- Jackson, P.S. (1981)
Note on a possible association between plasma β -carotene levels and conception rate in a group of winter-housed dairy cattle.
Anim. Prod. **32**, 109-111
- Jackson, P.S., B.J.A. Furr & C.T. Johnson (1981)
Endocrine and ovarian changes in dairy cattle fed a low β -carotene diet during an oestrus synchronisation regime.
Res. Vet. Sci. **31**, 377-383
- Jayaram, M., S.K. Murthy & J. Ganguly (1973)
Effect of vitamin A deprivation on the cholesterol side-chain cleavage enzyme activity of testes and ovaries of rats.
Biochem. J. **136**, 221-223
- Juneja, H.S., S.K. Murthy & J. Ganguly (1966)
The effect of vitamin A deficiency on the biosynthesis of steroid hormones in rats.
Biochem. J. **99**, 138-145

- Karrer, P., A. Helfenstein, H. Wehrli & A. Wettstein
(1930)
Pflanzenfarbstoffe. XXV. Über die Konstitution des
Lycopins & Carotins.
Helv. Chim. Acta 13, 1084-1099
- Karrer, P., R. Morf & K. Schopp (1931)
Zur Kenntnis des Vitamins-A aus Fischtranen II.
Helv. Chim. Acta 14, 1431-1436
- Klemt, P.W. (1986)
Auswirkungen einer Zufütterung von synthetischem
 β -Karotin auf das postpartale Fruchtbarkeitsgeschehen
von Vollblutstuten anhand von Progesteronprofilen aus
Milch.
Diss. med. vet., Hannover
- Knudsen, J.F., L.J. Litkowski, T.L. Wilson, H.D. Guthrie &
S.K. Batta (1979)
Follicular fluid electrolytes and osmolality in
cyclic pigs.
J. Reprod. Fert. 57, 419-422
- Koehn, C.J. (1948)
Relative biological activity of beta-carotene and
vitamin A.
Arch. Biochem. 17, 337-344
- Konermann, H. (1967)
Untersuchungen über die Herdensterilität des Rindes
unter Berücksichtigung der Zusammenhänge Boden -
Pflanze - Tier.
Habil. med. vet., Hannover
- Kormann, A.W. & M. Schlachter (1984)
Preliminary trials concerning growth and reproduction
of rabbits on variable supplementation of β -carotene
and vitamin A. In: Proc. III. World Rabbit Congress,
Rome, pp. 467-472
- Kornhauser, A., W. Wamer & A. Giles (1986)
Protective effects of beta-carotene against psoralen
phototoxicity: relevance to protection against
carcinogenesis.
Basic Life Sci. 39, 465-481
- Krinsky, N.I. & S.M. Deneke (1982)
Interaction of oxygen and oxy-radicals with
carotenoids.
J. Natl. Cancer Inst. 69, 105-210
- Kruip, T.A. & S.J. Dieleman (1982)
Macroscopic classification of bovine follicles and
its validation by micromorphological and steroid
biochemical procedures.
Reprod. Nutr. Develop. 22, 465-473

- Lakshmanan, M.R., H. Chansang & J.A. Olson (1972)
Purification and properties of carotene
15,15'-dioxygenase of rabbit intestine.
J. Lipid Res. **13**, 477-482
- Lakshmanan, M.R., J.L. Pope & J.A. Olson (1968)
The specificity of a partially purified carotenoid
cleavage enzyme of rabbit intestine.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **33**, 347-352
- Ledwitz-Rigby, F. & B.W. Rigby (1983)
The actions of follicular fluid factors on
steroidogenesis by cultured ovarian granulosa cells.
J. Steroid. Biochem. **19**, 127-131
- Löffler, G., P.E. Petrides, L. Weiss & H.A. Harper (1979)
Physiologische Chemie
Springer, Berlin.
- Lotthammer, K.-H. (1978)
Zur Bedeutung des β -Carotins für die Fruchtbarkeit
des Milchrindes.
Der Tierzüchter **12**, 520-529
- Lotthammer, K.-H., L. Ahlswede & H. Meyer (1976)
Untersuchungen über eine spezifische, Vitamin-A-
unabhängige Wirkung des β -Carotins auf die Fertilität
des Rindes. 2. Mitteilung: Weitere klinische Befunde
und Befruchtungsergebnisse (Versuch III).
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **53**, 351-390
- Lotthammer, K.-H. & L. Ahlswede (1977)
Untersuchungen über eine spezifische, Vitamin-A-
unabhängige Wirkung des β -Carotins auf die Fertilität
des Rindes. 3. Mitteilung: Blutserumuntersuchungen
(β -Carotin, Vitamin A, SGOT, Gesamtcholesterin,
Glukose, anorganischer Phosphor).
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **84**, 205-252
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall
(1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. **193**, 265-275
- Lundquist, N.S. & P.B. Phillips (1943)
Certain dietary factors essential for the growing
calf.
J. Dairy Sci. **26**, 1023-1050
- Marcek, J.M., L.H. Appell, C.C. Hoffman, P.T. Moredick &
L.V. Swanson (1985)
Effect of supplemental β -carotene on incidence and
responsiveness of ovarian cysts to hormone treatment.
J. Dairy Sci. **68**, 71-77

- Mathews-Roth, M.M. (1982)
Medical applications and uses of carotenoids. In:
Carotenoid Chemistry and Biochemistry. Britton, G. &
T.W. Goodwin (eds), pp. 297-307
- McNatty, K.P. (1978)
Follicular fluid. In: The Vertebrate Ovary.
Jones, R.E. (ed),
Plenum Press, New York, pp. 215-259
- McNatty, K.P., D.A. Heath, K.M. Henderson, S. Lun, P.R.
Hurst, L.M. Ellis, G.W. Montgomery & L. Morrison
(1984)
Some aspects of thecal and granulosa cell function
during follicular development in the bovine ovary.
J. Reprod. Fert. 72, 39-53
- Meinecke, B., W. Bittner & H. Gips (1986)
The effect of β -carotene on fertility in cows:
Clinical and endocrinological findings.
Zuchthyg. 21, 225-232
- Meyer, H., L. Ahlswede & K.-H. Lotthammer (1975)
Untersuchungen über eine spezifische, Vitamin-A-
unabhängige Wirkung des β -Carotins auf die Fertilität
des Rindes. 1. Mitteilung: Versuchsanstellung,
Körperentwicklung und Eierstockfunktion.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 82, 429-472
- Miller, K.W. & C.S. Yang (1985)
An isocratic high-performance liquid chromatography
method for the simultaneous analysis of plasma
retinol, α -tocopherol, and various carotenoids.
Anal. Biochem. 145, 21-26
- Moor, R.M. (1977)
Sites of steroid production in ovine graafian
follicles in culture.
J. Endocrinol. 73, 143-150
- Moor, R.M. (1978)
Role of steroids in the maturation of ovine oocytes.
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 18, 477-482
- Moor, R.M., C. Polge & S.M. Willadsen (1980)
Effect of follicular steroids on the maturation and
fertilization of mammalian oocytes.
J. Embryol. Exp. Morph. 56, 319-335
- Moor, R.M. & A.O. Trounson (1977)
Hormonal and follicular factors affecting maturation
of sheep oocytes in vitro and their subsequent
developmental capacity.
J. Reprod. Fert. 49, 101-109

- Moor, R.M. & G.M. Warnes (1978)
Regulation of oocyte maturation in mammals. In:
Control of Ovulation. Creighton, D.B. & G.R. Foxcroft
(eds), Butterworth, London, pp. 159-176
- Moore, T. (1930)
LXXIX. Vitamin A and carotene VI. The conversion of
carotene to vitamin A in vivo.
Biochem. J. **24**, 692-702
- Moseley, W.M., D.W. Forrest, C.C. Kaltenbach & T.G. Dunn
(1979)
Effect of norgestomet on peripheral levels of
progesterone and estradiol-17 β in beef cows.
Theriogenology **11**, 331-341
- Olcott, H.S. & D.C. McCann (1931)
Carotenase. The transformation of carotene to vitamin
A in vitro.
J. Biol. Chem. **94**, 185-193
- Olson, J.A. & O. Hayaishi (1965)
The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A
by soluble enzymes of rat liver and intestine.
Proc. Natl. Acad. Sci. **54**, 1364-1370
- Ott, D.B., M.S. Lachance & P.A. Lachance (1979)
Retinoic acid - a review.
Am. J. Clin. Nutr. **32**, 2522-2531
- Pascu, T., D. Mihai & H. Lunca (1969)
Concentration du sodium et du potassium dans le
liquide folliculaire normal et dans le liquide des
kystes folliculaires ovariens, ainsi que dans le sang
des memes vaches.
Rec. Med. Vet. **145**, 1283-1291
- Pascu, T., M. Suteanu & H. Lunca (1970)
Concentration de la vitamine C dans le liquide
folliculaire normal, pendant les differentes phases
du cycle oestral et dans le liquide des kystes
ovariens (folliculaires et luteiniques), ainsi que
dans le sang des memes vaches
Rec. Med. Vet. **146**, 1021-1029
- Perret, B.-P., J. Parinaud, H. Ribbes, J.-P. Moatti, G.
Pontonnier, H. Chap & L. Douste-Blazy (1985)
Lipoprotein and phospholipid distribution in human
follicular fluids.
Fert. Steril. **43**, 405-409
- Peters, H. (1978)
Folliculogenesis in mammals. In: The Vertebrate
Ovary. Jones, R.E. (ed), Plenum Press, New York,
pp. 121-144

- Pethes, G., E. Horvath, M. Kulcsar, G. Huszenicza, G. Somorjai, B. Varga & J. Haraszti (1985)
In vitro progesterone production of corpus luteum cells of cows fed low and high levels of beta-carotene.
Zbl. Vet. Med. A 32, 289-296
- Peto, R., R. Doll, J.D. Buckley & M.D. Sporn (1981)
Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?
Nature 290, 201-208
- Peukert-Adam, I., R. Zimmermann, G. Westhof, W. Brandle & E. Grunert (1984)
Mikromorphologie boviner Tertiärfollikel in Korrelation zu ihrem Steroid-Sekretionsmuster.
Zuchthyg. 19, 106
- Rakes, A.H., M.P. Owens, J.H. Britt & L.W. Whitlow (1985)
Effects of adding beta-carotene to rations of lactating cows consuming different forages.
J. Dairy Sci. 68, 1732-1737
- Rettura, G., F. Stratford, S.M. Levenson & E. Seifter (1982)
Prophylactic and therapeutic actions of supplemental β -carotene in mice inoculated with C3HBA adenocarcinoma cells: Lack of therapeutic action of supplemental ascorbic acid.
J. Natl. Cancer Inst. 69, 73-77
- Rhodes, J. (1983)
Human interferon action: reciprocal regulation by retinoic acid and β -carotene.
J. Natl. Cancer Inst. 70, 833-837
- Richards, J.S. (1978)
Hormonal control of follicular growth and maturation in mammals. In: The Vertebrate Ovary. Jones, R.E. (ed), Plenum Press, New York, pp. 331-359
- Roberts, A.B. & M.B. Sporn (1984)
Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: The Retinoids. Sporn, M.B., A.B. Roberts & D.S. Goodman (eds), Academic Press, Orlando/New York, pp. 209-286
- Sachs, L. (1978)
Angewandte Statistik
Springer, Berlin.
- Santamaria, L., A. Bianchi, A. Arnaboldi & L. Andreoni (1980)
Prevention of the benzo(a)pyrene photocarcinogenic effect by β -carotene and canthaxanthine. Preliminary study.
Boll. Chim. Farm. 119, 745-748

- Schams, D., B. Hoffmann, K.-H. Lotthammer & L. Ahlswede (1977)
Untersuchungen über eine spezifische Vitamin-A-unabhängige Wirkung des β -Carotins auf die Fertilität des Rindes. 4. Mitteilung: Auswirkung auf hormonale Parameter während des Zyklus.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **84**, 293-332
- Schweigert, F.J. (1986)
 β -Carotin-Stoffwechsel des Rindes: Verteilung auf die Serumlipoproteine, Transfer in die Milch und in die Follikelflüssigkeit sowie Funktion im Follikel.
Diss. med. vet., München
- Schweigert, F.J., A. Lutterbach, W.A. Rambeck & H. Zucker (1986)
Vitamin A and β -carotene concentrations in bovine follicular fluid in relationship to follicle size.
J. Vet. Med. A **33**, 360-364
- Schweigert, F.J., W.A. Rambeck & H. Zucker (1987)
 β -Carotene and vitamin A in the follicular development of the bovine species. In: Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals.
Roche, J.F. & D. O'Callaghan (eds.),
Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 55-62
- Schweigert, F.J. & H. Zucker (1988)
Concentrations of vitamin A, β -carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality.
J. Reprod. Fert. **82**, (in press).
- Seifter, E., G. Rettura, J. Padawer & S.M. Levenson (1982)
Moloney murine sarcoma virus tumors on CBA/J mice: Chemopreventive and chemotherapeutic actions of supplemental β -carotene.
J. Natl. Cancer Inst. **68**, 835-840
- Seifter, E., G. Rettura, J. Padawer, F. Stratford, P. Goodwin & S.M. Levenson (1983)
Regression of C3HBA mouse tumor due to X-ray therapy combined with supplemental β -carotene or vitamin A.
J. Natl. Cancer Inst. **71**, 409-417
- Seifter, E., G. Rettura, J. Padawer, F. Stratford, F. Weinzeig, A.A. Demetriou & S.M. Levenson (1984)
Morbidity and mortality reduction by supplemental vitamin A or β -carotene in CBA mice given total-body γ -radiation.
J. Natl. Cancer Inst. **73**, 1167-1177
- Seitaridis, K. (1963)
Untersuchungen über den Vitamin-A und β -Carotin-Gehalt des Blutplasmas in Rinderherden mit Störungen der Fruchtbarkeit unter besonderer Berücksichtigung der Carotinversorgung.
Diss. med. vet., Hannover

- Sexton, E.L., J.W. Mehl & H.J. Deuel (1946)
Studies on carotenoid metabolism VI. The relative provitamin A activity of carotene when introduced orally and parenterally in the rat.
J. Nutr. 31, 299-319
- Shalgi, R., P. Kraicer, A. Rimon, M. Pinto & N. Soferman (1973)
Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier.
Fert. Steril. 24, 429-434
- Shalgi, R., P.F. Kraicer & N. Soferman (1972)
Gases and electrolytes of human follicular fluid.
J. Reprod. Fert. 28, 335-340
- Sharma, R.V., S.N. Mathur, A.A. Dmitrowskii, R.C. Das & J. Ganguly (1977)
Studies on the metabolism of β -carotene and apo- β -carotenoids in rats and chickens.
Biochim. Biophys. Acta 486, 183-194
- Sharma, R.V., S.N. Mathur & J. Ganguly (1976)
Studies on the relative biopotencies and intestinal absorption of different apo- β -carotenoids in rats and chickens.
Biochem. J. 158, 377-383
- Shidoji, Y. & L.M. De Luca (1981)
Rat liver microsomes catalyze mannosyl transfer from GDP-D-mannose to retinyl phosphate with high efficiency in the absence of detergents.
Biochem. J. 200, 529-538
- Siedel, J., H. Schlumberger, S. Klose, J. Ziegenhorn & A.W. Wahlefeld (1981)
Improved reagent for the enzymatic determination of serum cholesterol.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 838-839
- Singh, H. & H.R. Cama (1974)
Enzymatic cleavage of carotenoids.
Biochim. Biophys. Acta 370, 49-61
- Sklan, D. (1983a)
Carotene-cleavage activity in chick intestinal mucosa cytosol: association with a high-molecular-weight lipid-protein aggregate fraction and partial characterization of the activity.
Br. J. Nutr. 50, 417-425
- Sklan, D. (1983b)
Carotene cleavage activity in the corpus luteum of cattle.
Int. J. Vit. Nutr. Res. 53, 23-26

- Smith, J.E. & D.S. Goodman (1979)
Retinol-binding protein and the regulation of vitamin
A transport.
Fed. Proc. **38**, 2504-2509
- Smith, J.E., P.O. Milch, Y. Muto & D.S. Goodman (1973)
The plasma transport and metabolism of retinoic acid
in the rat.
Biochem. J. **132**, 821-827
- Sporn, M.B. & A.B. Roberts (1984)
Role of retinoids in differentiation and
carcinogenesis.
J. Natl. Cancer Inst. **73**, 1381-1386
- Takase, S., D.E. Ong & F. Chytil (1979)
Cellular RBP allows specific interaction of retinol
with nucleus in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. **76**, 2204-2208
- Thibault, C. (1977)
Are follicular maturation and oocyte maturation
independent processes.
J. Reprod. Fert. **51**, 1-15
- Thommen, H. (1961)
Metabolism of 8'-apo- β -carotenal.
Chimia **15**, 433-436
- Tiews, J. (1963)
Vitamin A-Wirksamkeit der Carotine bei verschiedenen
Tierarten.
Wiss. Veröffentl. Dtsch. Ges. Ernähr. **9**, 235-262
- Tsafriri, A. (1978)
Oocyte maturation in mammals. In: The Vertebrate
Ovary. Jones, R.E. (ed), Plenum Press, New York,
pp. 409-442
- Tsonis, C.G., R.S. Carson & J.K. Findlay (1984)
Relationships between aromatase activity, follicular
fluid oestradiol-17 β and testosterone concentrations,
and diameter and atresia of individual ovine
follicles.
J. Reprod. Fert. **72**, 153-163
- Vartapetian, B.B., A.A. Dmitrovsky, D.G. Alkhasov, I.H.
Lemberg, A.B. Girshin, G.M. Gusinsky, N.A. Starikova
& N.N. Eropheeva (1966)
A new approach to the study of the mechanism of
biosynthesis of vitamin A from carotene by activation
of ^{18}O by the nuclear reaction $^{18}\text{O}(\alpha, \text{N})^{21}\text{Ne}$
using cyclotron-accelerated α -particles.
Biokhimiya **31**, 881-886

- Villard, L. & C.J. Bates (1986)
Carotene dioxygenase (EC 1.13.11.21) activity in rat intestine: effects of vitamin A deficiency and of pregnancy.
Br. J. Nutr. 56, 115-122
- Wald, G. (1968)
Molecular basis of visual excitation.
Science 162, 230-239
- Wiel, D.F.M., S. Bar-Ami, A. Tsafriri & F.H. Jong (1983)
Oocyte maturation inhibitor, inhibin and steroid concentration in porcine follicular fluid at various stages of the oestrus cycle.
J. Reprod. Fert. 68, 247-252
- Wildfeuer, I. (1969)
Metabolites in egg yolk after feeding hens 8'-apo- β -carotenal.
Z. Lebensmitt. Unters. Forsch. 140, 140-144
- Wolf, G. (1984)
Multiple functions of vitamin A.
Phys. Rev. 64, 873-937
- Woolf, B. & T. Moore (1932)
Carotene and vitamin A.
Lancet 223, 13-15
- Worker, N.A. (1957)
Site of conversion of carotene into vitamin A in the rat: further studies on aqueous dispersions administered intravenously.
Br. J. Nutr. 11, 44-47
- Zechmeister, L., A.L. LeRosen, W.A. Schroeder, A. Polgar & L. Pauling (1943)
Special characteristics and configuration of some stereoisomeric carotenoids including polycopene and pro- γ -carotene.
J. Am. Chem. Soc. 65, 1940-1951
- Zucker, H., O. Kreutzberg, W. Hollwich, D. Matzke, J. Kögel & G. Burgstaller (1980)
Untersuchungen zur Versorgung von Milchkühen mit β -Carotin und Vitamin A. 2. Mitteilung: Einfluß auf Konzentration in der Milch sowie klinisch-gynäkologische und hormonanalytische Befunde.
Zbl. Vet. Med. A. 27, 525-533

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. H. Zucker danke ich für die Überlassung des Themas und die freundlich gewährte Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. F. J. Schweigert für die jederzeit gewährte Unterstützung und die zahlreichen wertvollen Anregungen bei der Planung, Durchführung und Auswertung.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. Dr. habil. W. A. Rambeck, der stets als Ansprechpartner zur Verfügung stand.

Herrn Prof. Dr. H. P. Jennissen und Herrn J. Kaiser gilt mein Dank für wertvolle Hinweise bei den enzymanalytischen Arbeiten. Herrn Dr. Dr. habil. M. Stangassinger und Frau Bärbel Amann danke ich außerdem für die Unterstützung bei den Arbeiten im Isotopenlabor.

Besonders herzlich danken möchte ich Herrn Dr. M. Stohrer für die jederzeit gewährte, selbstlose Hilfe bei Problemen mit der HPLC.

Frau Antje Wetzel gilt mein Dank für die geduldige Einführung in die Laborarbeit und die stets gewährte freundliche Unterstützung, ebenso allen Mitarbeitern sowie den Kolleginnen und Kollegen, die mich bei der technischen Durchführung der Versuche unterstützt haben. Besonderer Dank gilt meinem Kollegen Stefan Geldner für wertvolle Anregungen und konstruktive Kritik.

Herrn Dr. B. Wirz und Herrn Dr. H. Bachmann von der Firma Hoffmann-La Roche, Basel danke ich für die Überlassung von ^{14}C -markiertem β -Carotin sowie für hilfreiche Ratschläge und Hinweise.

Herrn Dr. R. Koll vom Institut für Physiologie der TU München-Weihenstephan danke ich für die Hormonanalysen.

Diese Arbeit wurde durch ein Stipendium der bayerischen Graduiertenförderung unterstützt, wofür ich ebenfalls meinen Dank ausspreche.

LEBENS LAUF

Markus Josef Wierich	geb. am 22. Februar 1961 in Erlenbach
Eltern	Wolfgang Wierich, techn. Angest. Maria Wierich, geb. Weiss
Schul Ausbildung	1967-1971 Grundschule in Elsenfeld 1971-1980 math.-nat.-Zweig des H.-Staudinger-Gymnasiums Erlenbach
Abitur	27. Juni 1980
Studium	1980-1985 Studium der Tiermedizin an der LMU München
Staatsexamen	26. November 1985
Approbation	10. Februar 1986
Berufstätigkeit	April bis Juni 1985 als wissenschaft- liche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der LMU München
Stipendium	Juli 1986 bis November 1987 Stipendiat der bayerischen Graduiertenförderung

